

GENEXPRESSION VON GAS2L1 UND GAS2 IN PODOZYTEN UNTER  
EINFLUSS VON ADVANCED GLYCATION ENDPRODUCTS

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Von  
Stephan Hause  
Geboren am 11.07.1987 in Halle (Saale)

**Gutachter**

- 1. Prof. Dr. med. Gunter Wolf, MHBA, Jena**
- 2. Prof. Dr. Karl-Heinz Friedrich, Jena**
- 3. Prof. Dr. med. Karl Hilgers, Erlangen**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.09.2015**

## Abkürzungsverzeichnis

### Einheiten:

Da	Dalton
g	Gramm
l	Liter
m	Meter
M	Molare Lösung
mol	Mol
RLU	Relative Helligkeitseinheiten ( <i>relative light units</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
V	Volt

### Vorsätze

k	Kilo
m	Milli
μ	Mikro
n	Nano

### Weitere Abkürzungen

AA	Aminosäuren ( <i>Amino acid</i> )
Ac	Acetyliert
A dest.	Destilliertes Wasser
AGE	<i>Advanced Glycation Endproducts</i>
AK	Antikörper
AT <sub>1</sub> -R	Angiotensin II Rezeptor Type 1
BCAR 1	<i>breast cancer anti-estrogen resistance 1</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare ( <i>base pairs</i> )
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CH	Calponin Homologe Struktur

## Abkürzungsverzeichnis

CML	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyllysin
C <sub>T</sub>	Schwellenwert Zyklus ( <i>cycle threshold</i> )
Δ	Differenz
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DM	Diabetes melitus
DN	Diabetische Nephropathie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
Epo	Erythropoetin
FKS	Fötales Kälber Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS2	<i>Growth arrest specific Protein 2</i>
GAS2L1	<i>Growth arrest specific Protein 2 related Protein 1</i>
GAR22	<i>Growth arrest related protein</i> auf Chromosom 22, Synonym GAS2L1
HbA1c	Glykiertes Hämoglobin
hGAR22	Humanes <i>GAS2L1</i>
IHC	Immunhistochemie
IKSBP	Interferon Konsensus Sequenz bindende Protein
ISH	<i>In Situ</i> Hybridisierung
MAPK	<i>mitogen-activated protein-</i> kinase
Mdm2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MSR	<i>macrophage scavenger receptors</i>
NBT/BCIP	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/ 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NIPP1	<i>Nuclear inhibitor of Protein Phosphatase 1</i>
P	Phosphor
p53	Protein 53
PBS	<i>phosphate buffered solution</i>
PKC	Proteinkinase C
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>

## Abkürzungsverzeichnis

RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System.
RAGE	Rezeptor für AGE
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SD	Standardfehler
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ( <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SSC	Natriumzitrat-Puffer ( <i>Saline-Sodium Citrat</i> )

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung .....	3
2.1. Niere.....	3
2.2. Advanced Glycation Endproducts (AGE).....	6
2.3. Spezifischer AGE Rezeptor RAGE.....	8
2.4. <i>Growth Arrest Specific 2</i> Protein.....	9
2.5. <i>Growth Arrest Specific 2 like 1</i> .....	11
2.6. Mausmodell für den <i>Diabetes mellitus</i> Typ 2.....	13
3. Zielstellung .....	15
4. Material und Methoden.....	16
4.1. Material.....	16
4.1.1. Chemikalienliste .....	16
4.1.2. Kits und Hilfsmittel.....	16
4.1.3. Zellkulturmedien und Zusätze .....	17
4.1.4. Antikörper.....	17
4.1.5. Primer .....	17
4.1.6. Puffer und Lösungen .....	18
4.1.7. Bakterien und Plasmide .....	20
4.2. Methoden .....	20
4.2.1. Herstellung von AGE-BSA und Kontroll-BSA .....	20
4.2.2. Zellkultur .....	20
4.2.3. Blockierung des AGE Rezeptors RAGE .....	21
4.2.4. Genotypisierung der diabetischen Mäuse.....	22
4.2.5. Analyse von <i>db/db</i> Mäusen .....	22
4.2.6. RNS Gewinnung .....	23
4.2.7. cDNS Herstellung.....	23
4.2.8. Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	24
4.2.9. Real Time PCR .....	24
4.2.10. Plasmid- und Sondenherstellung.....	25
4.2.11. <i>In-situ</i> Hybridisierung.....	27
4.2.12. Proteinnachweis mit dem Western Blot .....	29

## Inhaltsverzeichnis

4.2.13. Immunhistochemischer Nachweis von GAS2-Protein.....	31
4.2.14. Transfektion und Überexpression.....	33
4.2.15. Apoptose Assay .....	35
5. Ergebnisse .....	36
5.1. Expression der <i>GAS2L1<math>\alpha</math></i> mRNS in Podozyten.....	36
5.2. <i>In Situ</i> Hybridisierung von <i>GAS2L1<math>\alpha</math></i> .....	38
5.3. Überexpression von <i>GAS2L1<math>\alpha</math></i> .....	38
5.4. Myc-markierte - <i>GAS2L1<math>\alpha</math></i> Immunhistochemie in Podozyten .....	39
5.5. Einfluss von <i>GAS2L1<math>\alpha</math></i> auf die Apoptose in Podozyten .....	40
5.6. <i>GAS2L1</i> Expression <i>in vivo</i> .....	40
5.7. Expression von <i>GAS2</i> -mRNA in Podozyten .....	41
5.8. <i>In situ</i> Hybridisierung von <i>GAS2</i> .....	43
5.9. Western Blot Untersuchung des <i>GAS2</i> Proteins .....	44
5.10. <i>GAS2</i> Proteinexpression in Podozyten bei Blockade von RAGE.....	45
5.11. Immunhistochemie von <i>GAS2</i> .....	47
5.12. Analysen in <i>db/db</i> -Mäusen.....	48
5.12.1. <i>GAS2</i> mRNS-Expression in <i>db/db</i> -Mäusen .....	48
5.12.2. Immunhistochemische Untersuchung von <i>GAS2 in vivo</i> .....	49
6. Diskussion .....	53
6.1. <i>GAS2L1</i> .....	54
6.1.1. <i>GAS2L1</i> -mRNS Expression .....	54
6.1.2. Überexpression des <i>GAS2L1<math>\alpha</math></i> -Protein .....	56
6.2. <i>GAS2</i> .....	57
6.2.1. <i>GAS2</i> -RNS Expression .....	57
6.2.2. <i>GAS2</i> -Proteinexpression.....	57
6.2.3. <i>GAS2</i> Immunhistochemie und Immunfluoreszenz .....	58
6.3. Blockade des anti-RAGE-Rezeptors via anti-RAGE-Antikörper .....	60
7. Schlussfolgerungen.....	62
8. Literatur- und Quellenverzeichnis.....	64
9. Anhang.....	70

### 1. Zusammenfassung

- Die diabetische Nephropathie (DN), als eine in ihrer Pathogenese noch immer nicht vollständig erforschte Krankheit, stellt die häufigste Ursache für ein terminales, dialysepflichtiges Nierenversagen in der westlichen Hemisphäre dar. Die DN tritt dabei hauptsächlich durch die Schädigung der Glomeruli als noduläre oder diffuse Glomerulosklerose auf. In den Glomeruli sind vor allem die Podozyten primär betroffen, welche der wichtigste Bestandteil der Ultrafiltrationsbarriere sind.
- *Advanced Glycation Endproducts* (AGE) entstehen aufgrund des erhöhten Glukosespiegels vermehrt durch irreversibler Glykierung von Proteinen und Lipiden. Sie sind als wichtige Mediatoren in der Pathogenese der Diabetes zu nennen. Diese initiieren, unter anderem über einen eigenständigen Rezeptor (RAGE), diverse Stoffwechselvorgänge in den Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Schädigung der Podozyten unter dem Einfluss der AGEs in Bezug auf zwei Gene des Zellzyklusarrest untersucht: *Growth Arrest Specific 2* (GAS2) und *Growth arrest specific 2 like 1* (GAS2L1), die auch in der Apoptose eine Rolle spielen. Für *in vivo*-Analysen wurden Mäuse mit genetisch bedingtem Diabetes Typ 2 verwendet (*db/db* Mäuse).
- Für die Analyse der Gen- und Protein-Expression von GAS2 und GAS2L1 wurden die Podozyten mit glykiertem bovines Serumalbumin (AGE-BSA) und für die Kontrollreaktion entsprechend mit einem unglykierten Kontroll-BSA (Co-BSA), behandelt. Um dabei den Einfluss von RAGE beurteilen zu können, wurden die Zellen mit einem anti-RAGE-Antikörper behandelt.
- Der Nachweis sowohl von *GAS2L1 $\alpha$*  als auch von GAS2 in Podozyten erfolgte über *in situ* Hybridisierung (ISH). Zusätzlich wurde eine Überexpression der  $\alpha$ -Isoform *GAS2L1* in Podozyten induziert und die Apoptoserate durch Caspase Glo Assay bestimmt.
- Die Proteinexpression konnte nur für GAS2 durch Western Blots und Immunhistochemie (IHC) analysiert werden, da für GAS2L1 kein kommerzieller Antikörper zur Verfügung stand. Für die *in vivo* Detektion des GAS2 wurden paraffineingebettete Nierenschnitte von *db/db* und Kontroll- (*db/m*) Mäusen



## Zusammenfassung

untersucht. Es wurden sowohl Fluoreszenzfärbungen, als auch Färbungen mit dem Avidin/Biotin System durchgeführt.

- In mit AGE-BSA behandelten Podozyten konnte in der Real-time PCR eine nicht signifikante Steigerung der *GAS2L1* mRNA beobachtet werden. Die in Podozyten gezeigten Effekte konnten über eine Blockierung von RAGE mit einem anti-RAGE-Antikörper reduziert werden. *GAS2L1* war in den Nieren von *db/db*-Mäusen im Vergleich zu *db/m*-Mäusen signifikant erhöht.
- Die *in situ* Hybridisierung zeigte für *GAS2L1α* eine schwache Erhöhung der Expression, was die Real Time PCR Daten bestätigten.
- Die Überexpression von *GAS2L1α* wies im Caspase Glo Assay eine gesteigerte Apoptoserate in den transfizierten Podozyten nach. Diese Effekte waren unter AGE-BSA Behandlung am stärksten und bei Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS) am schwächsten und bedürfen weiterer Analysen.
- Die Analyse der *GAS2* mRNA zeigte eine signifikante Erhöhung unter AGE-BSA Behandlung. Dieser Effekt war reversibel bei Blockierung des RAGE. In diabetischen *db/db*-Mäusen wurde im Verhältnis zu den nicht diabetischen *db/m*-Mäusen ein nicht signifikanter Anstieg gemessen.
- Im Western Blot konnten die *in vivo*-Effekte *in vitro* bezüglich *GAS2* bestätigt werden. Die IHC-Untersuchungen von *GAS2* in Podozyten zeigten unter AGE-BSA Behandlung im Vergleich zu Co-BSA ebenfalls eine Erhöhung des *GAS2* Proteins. Es konnte jedoch keine bedeutenden Änderungen hinsichtlich der Lokalisation des Proteins beobachtet werden. Die Veränderungen durch AGE-BSA waren teilweise reversibel bei Blockierung von RAGE. Die IHC-Analyse der *GAS2*-Proteinexpression in Paraffinschnitten der diabetischen Mäuse zeigte eine relativ starke glomeruläre Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren.
- Eine Erhöhung von *GAS2L1α*, *GAS2* und *GAS2*-Protein unter AGE bzw. diabetischen Bedingungen konnte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. *In vitro* zeigte sich eine Abhängigkeit vom Rezeptor RAGE. Die Bedeutung der Proteine für den bei der DN beobachteten Zellzyklusarrest und die Einbindung in die entsprechenden Signalkaskaden ist weiter zu klären. Die Effekte der Überexpression von *GAS2L1* auf die Zytoskelettstruktur und Apoptose in Podozyten sollten weiter analysiert werden.

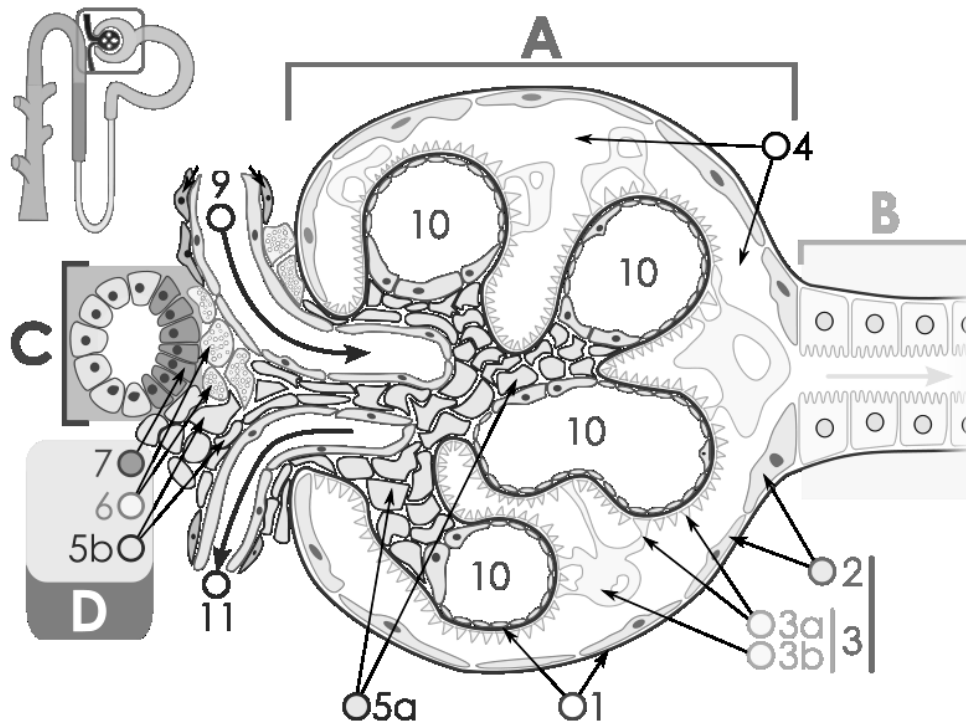
## 2. Einleitung

### 2.1. Niere

Die Funktionen der Niere ist vielfältig: Sie ist zuständig für die Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen, für den Elektrolyt- und Säure-Basenhaushalt. Weiterhin ist die Niere über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) in die Blutdruckregulierung involviert und erfüllt endokrinologische Aufgaben wie die Regulierung der Erythrozytenkonzentration durch Erythropoetinproduktion und die Umwandlung des Vitamin D<sub>2</sub> in die aktive Vitamin D<sub>3</sub> Form (Deetjen et al. 2005)

Funktionell ist die Niere aus vielen, ähnlichen Einheiten aufgebaut. Diese Einheiten, die Nephrone, bestehen aus einem, in der Rinde gelegenen, Nierenkörperchen und daran anschließend dem Tubulussystem, welches bis tief in das Nierenmark ziehen kann. Bestehend aus dem Glomerulum und der Bowmankapsel, ist das Nierenkörperchen für die Filtration des Primärharns zuständig. Gebildet wird das Nierenkörperchen hauptsächlich aus vier verschiedenen Zellarten: Den Mesangiumzellen, den juxtaglomerulären Zellen und den Podozyten sowie Endothelzellen.

Die Podozyten sind zusammen mit den Endothelzellen und der Basalmembran für die wichtigste Funktion des Glomerulum verantwortlich: die Blut-Harnschanke (Ultrafiltrationsbarriere). Hervorzuheben ist hier die Basalmembran, welche vorwiegend von den Podozyten und Endothelzellen gebildet wird und eine negative Nettoladung besitzt, wodurch Moleküle mit negativer Ladung (z.B. Albumin) nicht filtriert werden. Die von den Podozytenfortsätzen gebildeten Schlitzdiaphragmen stellen die eigentliche filtrierende Einheit dar und sind somit von entscheidender Bedeutung (Deetjen et al. 2005). Eine schematische Darstellung des Aufbaus eines Glomerulus zeigt **Abbildung 1**.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Nierenkörperchens.** A: Nierenkörperchen; B: Proximaler Tubulus; C: Distaler Tubulus; D: Juxtaglomeruläre Apparat. 1: Basalmembran; 2: Bowmansche Kapsel; 3: Podozyt (3a: Podozytenfortsätze); 4: Harnraum; 5: Mesangiumzellen (5a: intraglomerulär, 5b: extraglomerulär) 6: Juxtaglomeruläre Zellen; 7: Macula densa; 9: Zuführendes Gefäß (Arteriola afferens); 10: glomeruläre Kapillaren; 11: Ableitende Gefäß (Arteriola efferens) (modifiziert nach Komorniczak 2009)

Auch viele weitere für die Langzeitschäden der Diabetes zuständige Mediatoren werden über die Niere metabolisiert oder ausgeschieden und akkumulieren dementsprechend bei Nierenschädigung umso stärker.

Die diabetische Nephropathie (DN) ist in der westlichen Hemisphäre die häufigste Ursache für ein terminales Nierenversagen mit etwa 28% Prozent in einer der beiden Formen des Diabetes mellitus (DM) (Frei und Schober-Halstenberg 2008). So entwickeln etwa 30-40 % der Patienten mit DM Typ1 oder Typ2 eine DN (Landgraf 1996). Bei einem Teil dieser Patienten wiederum entwickelt sich das Vollbild einer terminalen Niereninsuffizienz (Ritz et al. 1996).

Pathologisch lassen sich bei der DN mikroskopisch sowohl Veränderung der Glomeruli als auch der Tubuli (Choudhury et al. 2010), wobei eine Verdickung der glomerulären Basalmembranen und das Auftreten einer Mikroalbuminurie in der Regel die ersten und häufigsten Veränderungen, nachweisen. Die Verdickung der glomerulären Basalmembran führt zu einer verminderten Filtrationsrate. Die langzeitige Schädigung auch vaskulärer Strukturen führt schlussendlich zu Sklerosierungen und damit zum Funktionsverlust der filtrierenden Einheiten bis hin zur vollständigen Glomerulosklerose (Tervaert et al. 2010). Parallel dazu finden auch

## Einleitung

am Tubulus entzündliche und atrophische Prozesse statt. Diese führen zur tubulären Atrophie, interstitiellen Fibrose und der fast vollständigen Einschränkung der Filtrations- und Sezernierungsfunktion der betroffenen Einheit.

Im Folgenden sollen die pathophysiologischen Faktoren und Mediatoren, die zu diesen Veränderungen führen, näher beschrieben werden.

Unter diabetischen Bedingungen kommt es – neben dem direkten Einfluss der Glukose – auch zu weiteren extrarenalen Veränderungen, welche quasi als Mediatoren der DN zählen können. So bedingen Mikro- und Makroangiopathie eine Verminderung des renalen Blutflusses und eine reaktive Hypertonie über Aktivierung des RAAS. Weiterhin entstehen unter hyperglykämischen Bedingungen vermehrt *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und verursachen hierdurch oxydativen Stress in den Zellen. NF- $\kappa$ B und andere Mediatoren wiederum induzieren proinflammatorische Prozesse, wie die Synthese verschiedener proinflammatorischer Zytokine. *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) spielt ebenfalls eine Rolle bei der Zellhypertrophie und bei der überschießenden Bildung von extrazellulären Proteinen (Lee et al. 2007).

Außerdem wirken AGEs über direkte Rezeptoren und können so gezielt Stoffwechselwege in Gang setzten. Auf diese Signalwege soll später noch genauer eingegangen werden.

Auch die Proteinkinase C (PKC) wurde als ein bedeutender Mediator identifiziert, da sie über Diacylglycerol unter anderem zur endothelialen Dysfunktion führt (Kanwar et al. 2008). Als zentraler Bestandteil vieler Stoffwechselwege konnte durch eine verstärkte Inhibierung der Proteinkinase C eine Verringerung der Nierenschäden in diabetischen Mäusen induziert werden (Wolf 2004).

*In vitro* Versuche zeigten, dass viele der genannten Prozesse auch direkt durch Hyperglykämie in Podozyten vermittelt werden und zu deren Apoptose führen können (Durvasula und Shankland, 2008).

Die Hyperglykämie beeinflusst ebenso das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS). Ein Zusammenspiel all dieser Faktoren bedingt auf lange Zeit die Apoptose der Podozyten, die Verdickung der Basalmembran und die Zunahme der extrazellulären Matrix im Tubulussystem (Welsh und Coward 2010). So stoßen alle Komponenten des RAAS profibrotische Prozesse über Mediatoren wie TGF- $\beta$  und proinflammatorische über Zytokine an, welche über den *mitogen-activated protein-kinase* (MAPK)-Signalweg extrazelluläre Matrix Proteine wie Kollagen Typ I,

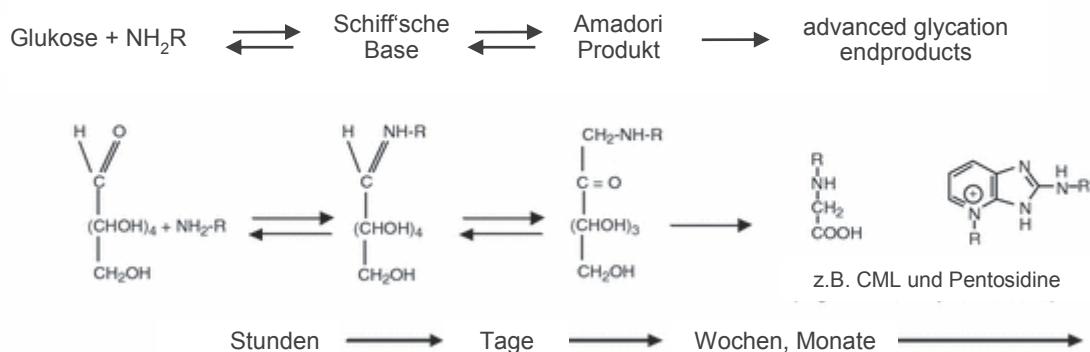
Prokollagene und Fibronektin hochregulieren (Wolf 2008). Dies führt schlussendlich zur Glomerulosklerose und zur tubulointestinalen Fibrose.

Es führen also viele Prozesse, wie die Hyperglykämie oder indirekt über AGEs und reaktive Sauerstoffspezies aber auch eine mögliche Hyperlipidämie, zur Aktivierung verschiedener pathophysiologischer Prozesse. Im intrazellulären Bereich induzieren die verschiedenen oben genannten Stoffwechsel- und Regulationswege zum Teil über positive Rückkopplungs-mechanismen und führen zu den typischen Veränderungen der DN.

## 2.2. Advanced Glycation Endproducts (AGE)

Die sehr heterogene Gruppe der *Advanced Glycation Endproducts* (AGE) wird durch die irreversible, nicht enzymgesteuerte Reaktion der Carboxylgruppe - reduzierender Kohlenhydraten mit Aminogruppen charakterisiert. Diese, nach ihrem Erstbeschreiber benannte, Maillard-Reaktion kann sowohl Proteine, Aminosäuren, Nukleinsäuren als auch Lipide betreffen (Wells-Knecht et al. 1996). Sie läuft über komplexe Reaktionswege unkontrolliert ab und benötigt mehrere Wochen bis Monate. Dies hat zur Folge, dass vor allem Strukturproteine mit langer Halbwertszeit stärker betroffen sind, da diese keinem schnellen Stoffwechsel unterliegen.

Die Maillard-Reaktion setzt sich aus mehreren Schritten zusammen: Zuerst reagiert die Carboxylgruppe des Zuckers reversibel mit einem primären Amin und bilden so eine Schiff'sche Base. Die Umlagerung dieser zu einem Amadori Produkt mit sekundärem Amin dauert mehrere Tage. Der irreversible Schritt zum AGE erfolgt durch Abspaltung eines Teils des ehemaligen Glukosemoleküls (Siehe **Abbildung 2**, Busch 2010).



**Abbildung 2: Reaktionsweg der Entstehung von AGE** sowie die Strukturformel von Pentosidin (nach Busch 2010).

## Einleitung

AGEs zeichnen sich allgemein durch eine schlechtere Wasserlöslichkeit als ihre Ausgangsstoffe und die Möglichkeit der Fluoreszenz aus. Wobei die Fluoreszenz nur bei einigen AGEs gegeben ist, welche die entsprechenden konjugierten Doppelbindungssysteme verfügen (z.B. Pentosidin).

Die kovalente Bindung führt zu einer hohen Resistenz gegenüber proteolytischen Enzymen. Die Maillard-Reaktion kommt auch unter physiologischen Bedingungen im Körper vor, jedoch führt erhöhter oxydativer Stress oder ein erhöhter Blutglukosespiegel zu einer Beschleunigung der Reaktion. Als bekanntestes klinisches Beispiel dieser Reaktion, das auch typischerweise bei DM erhöht ist, sei das glykierte Hämoglobin (HbA1c) genannt.

AGEs können in glykierte Proteine und glykierte Aminosäuren unterteilt werden, wobei sich beide Gruppen stark in ihrem Eliminationsweg unterscheiden. Vor allem letztere steigen unter Dialysebedingungen überproportional stark an (Thornalley und Rabbani 2009).

Die AGEs werden nach glomerulärer Filtration durch Tubuluszellen absorbiert (Gugliucci und Bendayan 1996). Vor allem der proximale Tubulus ist stark in den Metabolismus der AGEs eingebunden (Saito et al. 2005). So entsteht bei der DN ein *circulus vitiosus*; die schädigenden Produkte können nicht mehr eliminiert werden, akkumulieren und führen zu weiteren Schädigungen (Busch 2010).

Die verstärkte lokale Konzentration von AGEs beeinflusst die Regulation unterschiedlicher Proteine in Podozyten. So bedingen AGEs eine erhöhte Expression und eine Umverteilung des *breast cancer anti-oestrogen resistance 1* Proteins (BCAR1, auch p100CAS) in Podozyten (sowohl *in vitro* als auch *in vivo*) (Ha 2013), wobei BCAR1 an filamentöses Aktin der Podozytenfortsätze bindet (Barrett 2013).

Weiterhin ist eine Verminderung des Neuropilins durch Suppression des Sp1-Transkriptionsfaktor unter AGE-Einfluss bekannt (Bondeva und Wolf 2009), wobei eine Verbindung zwischen diesen und BCAR1 in endothelialen Zellen nachgewiesen werden konnte (Evans et al. 2011). Die Zugabe von AGEs erhöht *in vitro* sowohl die Sterberate von Podozyten als auch die Expression des Angiotensin II Rezeptors (AT<sub>1</sub>-R). Diese Effekte konnten durch Zugabe von Angiotensin II Rezeptor-Blockern (Sartanen) inhibiert werden (Fukami et al. 2013).

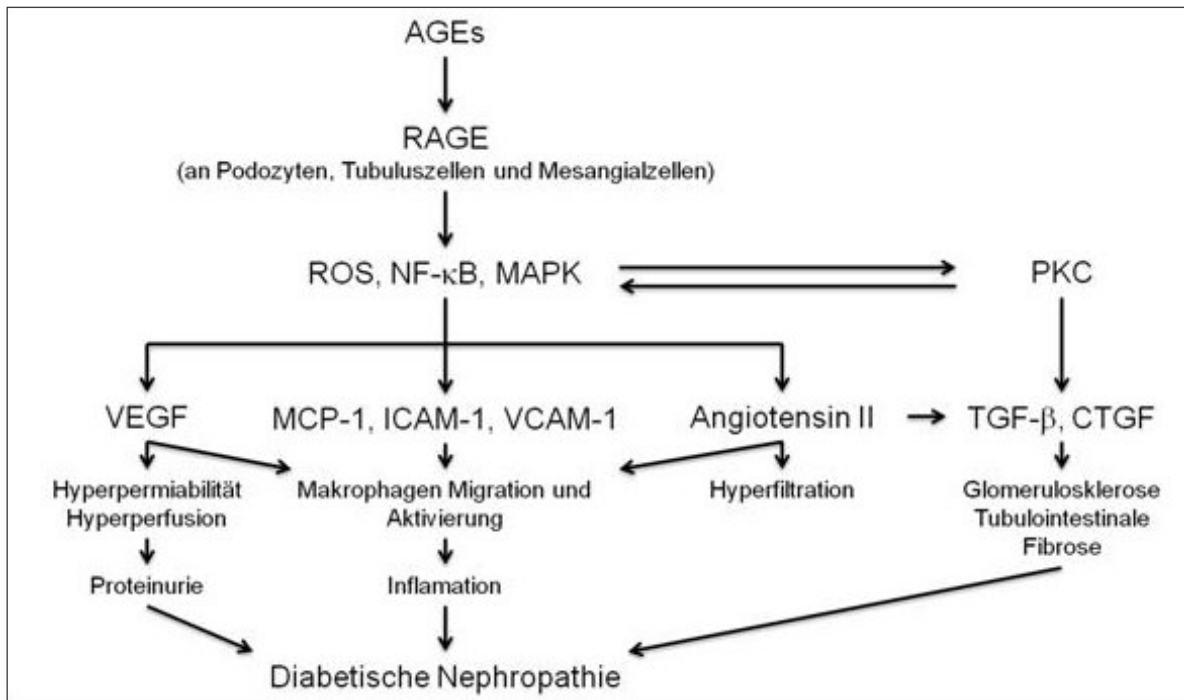
### 2.3. Spezifischer AGE Rezeptor RAGE

Neben den Rezeptoren, die zur Metabolisierung und Eliminierung der AGEs dienen, existieren jene, die Stoffwechselwege über AGEs induzieren. Diese binden mit unterschiedlicher Spezifität die diversen Subklassen und Substanzen der AGEs. Die wichtigsten Vertreter dieser Rezeptoren sind: RAGE, AGE-R1 (auch OST-48, p60), AGE-R2 (80KH Phosphoprotein) und AGE-R3 (galectin-3) (Neeper et al. 1992).

Obwohl RAGE vor allem unter hyperglykämischen Bedingungen beschrieben wurde und dort auch eine führende Rolle einnimmt, gehört er zur Familie der *multi-pattern-recognition* Rezeptoren, die Struktur motive binden. Neben AGEs sind auch S100 Proteine, Amyloid- $\beta$  Peptide und das *high-mobility group box 1*-Protein Liganden von RAGE (Rouhiainen et al. 2013). Er ist damit in die Immunglobulin-Superfamilie der Transmembranproteine einzuordnen. Die Bindung von Liganden an RAGE mündet in der Aktivierung von diversen Signalkaskaden wie die des NF- $\kappa$ B. Dieses wiederum reguliert die Genexpression unter anderem von RAGE, aber auch die einer Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren (Tsuji et al 2008) (Pichiule et al. 2007).

Außer den membranständigen Formen existieren die löslichen Formen des Rezeptors wie soluble RAGEs (sRAGE). Diese binden AGE als kompetitive Antagonisten zu den membranständigen Rezeptoren (Rouhiainen et al. 2013).

Die AGE-RAGE-Achse trägt zu der bereits erwähnten Pathophysiologie der AGEs wie Inflammation, Apoptose und die Ausbildung der DN bei. Dabei aktiviert er sowohl die bereits im oberen Abschnitt genannten Faktoren als auch weitere Faktoren, wie z.B. den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) oder diverse Adhäsionsfaktoren wie MCP-1, ICAM-1 oder VCAM-1 (**Abbildung 3**).



**Abbildung 3: Signalwege des RAGE hin zur diabetischen Nephropathie.** Dargestellt sind die verschiedenen Verbindungen zwischen RAGE, den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), NF-κB und MAPK, sowie deren jeweilige Mediatoren wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), Adhäsionsproteine, Angiotensin II und TGF-β (nach Yamagishi und Matsui 2010).

Die Expression von RAGE konnte unter physiologischen Bedingungen in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, so z.B. in Endothelzellen, in glatter Muskulatur aber auch in neuronalem Gewebe (Sorci et al. 2004, Soulis et al. 1997). Bei letzteren konnte auch bei diabetischen Patienten eine Hochregulation des Rezeptors gefunden werden (Haslbeck et al. 2007). In Podozyten wurde hingegen nur eine geringe Expression gefunden; erst unter diabetischen Bedingungen wurde eine bedeutende Hochregulierung von RAGE nachgewiesen. In Mesangialzellen und Tubuluszellen konnte *in vitro* eine RAGE-Expression durch Real-Time PCR detektiert werden (Bondeva et al. 2013).

## 2.4. Growth Arrest Specific 2 Protein

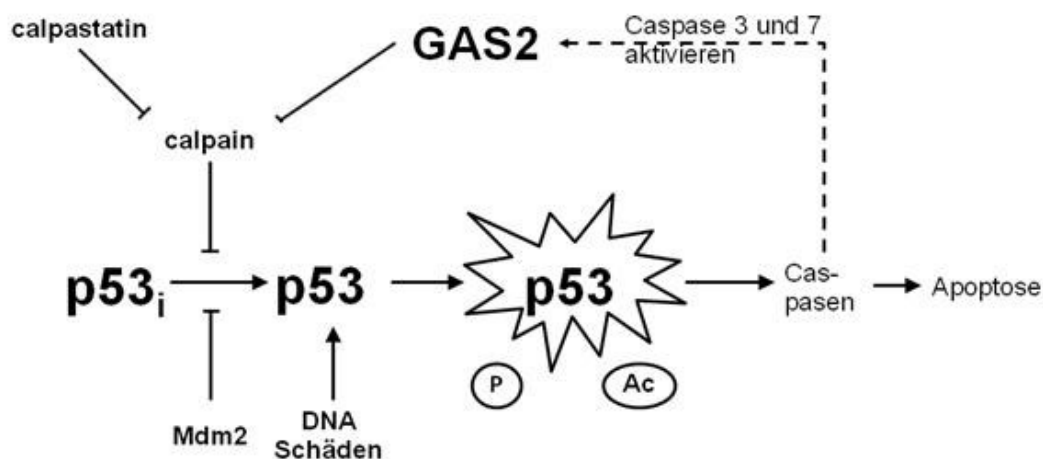
Das Zellwachstum bzw. dessen Regulation schließt die Apoptose als programmierten Zelltod mit ein. Eines der zentral regulierenden Proteine der Apoptose ist das Protein p53, dessen Aktivität durch verschiedene Einflüsse wie DNS-Schädigung, Oxidationsschäden, Hypoxie u.v.a. geregelt wird (Giaccia und Kastan 1998). Neben wichtigen Regulatoren wie z.B. Mdm2, spielen Calpain und dessen Inhibitor, Calpastatin eine wichtige Rolle (Gonen et al. 1997). Die Wirkung der aktivierten Form



des p53 resultiert letztendlich in der Aktivierung der Caspasen. Diese Proteine sind die eigentlichen Effektoren der Apoptose. Vor der Initiierung der apoptotischen Kaskade tritt die Zelle meist in einen Arrest, die G<sub>0</sub>-Phase um ein weiteres Wachstum zu unterbinden. Auch terminal differenzierte Zellen wie die Podozyten befinden sich in dieser Phase des Zellzyklus. Gene und deren zugehörige Proteine, die hauptsächlich in dieser G<sub>0</sub>-Phase exprimiert werden, bezeichnet man *Growth Arrest Specific*, als Zellzyklusarrestgene.

Das *Growth Arrest Specific 2* Protein (GAS2) wird in der G<sub>0</sub>-Phase verstärkt exprimiert. Das GAS2-Protein spielt bei Entwicklungsprozessen und der Apoptose eine Rolle. Es wurde erstmals im Jahre 1988 in Fibronblasten beschrieben (Schneider et al. 1988). Das Protein selber steht in Verbindung mit den Mikrofilamenten. Während der Apoptose wird es durch die Caspasen 3 und 7 am C-terminalen Ende gespalten (Sgorbissa et al. 1999). Die Deletion des C-Terminus führt zu einer Neuorganisation des Zytoskellets, speziell des Aktins und damit zur Änderung der Zellform (Lee KKH. 1999, Sgorbissa et al. 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass eine GAS2-Überexpression die Anfälligkeit der Zelle für Apoptosetrigger (z.B. bei UV Schäden, Etoposid oder Methyl-Methanesulfonate) anfällig macht, da es die Stabilität und Transkription des p53 erhöht (Benetti et al. 2001). Dies geschieht über die Bindung an m-Calpain, was dasselbe hemmt. Das GAS2-Protein hat somit eine ähnliche Funktion wie Calpastatin (**Abbildung 4**).



**Abbildung 4: Einfluss von GAS2 auf die Regulation von Calpain und p53.** Die Aktivierung des inaktivierten p53 (p53<sub>i</sub>) wird durch Mdm2 und Calpain gehemmt. Dieses wiederum wird durch Calpastatin und GAS2 gehemmt. GAS2 fördert also indirekt die Aktivierung des p53. Während der Apoptose wirkt das vollständig phosphorylierte (P) und acetylierte (Ac) p53 als Aktivator der Caspasen. Die Caspase 3 und 7 wiederum aktivieren das GAS2-Protein, die zu Änderungen am Aktin-Zytoskelett führen (nach Benetti et al. 2001).

Analysen in myeloischen Zellen zeigten, dass das Interferon Konsensus Sequenz bindende Protein (IKSBP) in Verbund mit der ETS Variante 6 sowie der Histon-Deacetylase 3, eine Unterdrückung von GAS2 herbeiführte (Huang 2010).

Bei einem anderen Gen der GAS-Familie, dem GAS6, sind die Zusammenhänge zwischen RAAS-System und DN bereits untersucht wurden. So konnte der Zusammenhang zwischen Angiotensin II als Induktor des Vitamin K abhängigen GAS6 und dessen Wirken über den Tyrosin Kinase Rezeptor Axl gezeigt werden (Park et al 2009). Ähnliche Regulationsmechanismen sind beim GAS2 bisher nicht beschrieben.

GAS2 wird in allen Zellen exprimiert, die unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren stehen. Das Protein liegt dann meist in hyperphosphorylierter und Membran-gebundener Form vor (Goriounov et al. 2003). Wird das C-terminale Ende bis zu einer funktionell wichtigen Asparaginsäure (Position 279) deletiert, so treten starke Veränderungen im Aktin-Zytoskelett auf (Benetti et al. 2001).

Beim Übergang von Fibroblasten aus der G<sub>0</sub>-Phase zurück in die G<sub>1</sub>-Phase wurden eine starke Phosphorylierung und eine damit einhergehende Umverteilung in eine membrangebundene Form beobachtet (Brancolini und Schneider 1994).

### **2.5. Growth Arrest Specific 2 like 1**

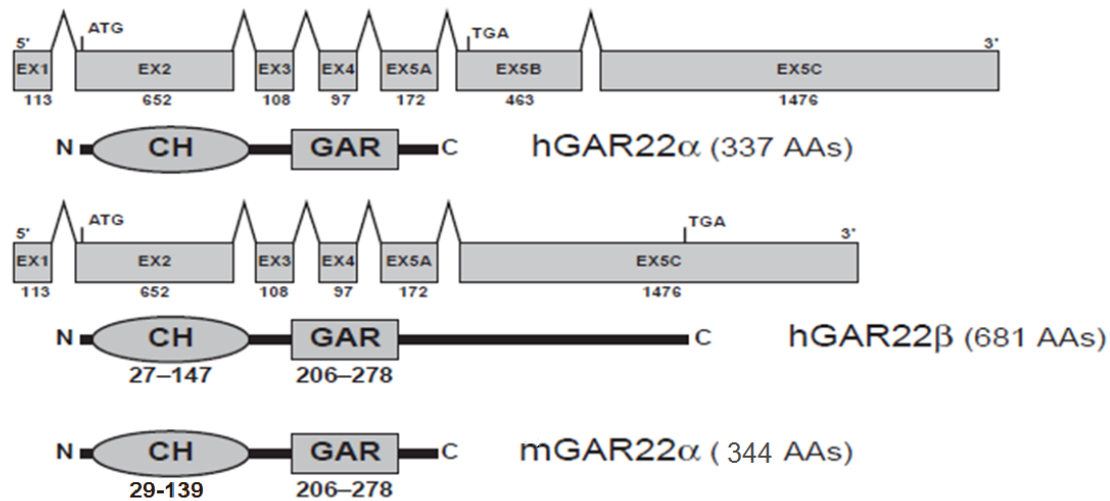
1996 wurde bei der Suche nach Tumorsuppressorgenen von der Arbeitsgruppe von Zucman-Rossi ein Protein entdeckt, das ähnliche Bindungseigenschaften besitzt wie GAS2 (Zucman-Rossi et al. 1996). Beim Menschen befindet sich das kodierende Gen auf dem Chromosom 22 und wurde dementsprechend als humanes GAS2 *related* (hGAR22) oder *GAS2 like 1* (GAS2L1) benannt.

Gleichsam zum GAS2 bildet das GAS2L1-Protein eine Verbindung zwischen Aktin via der Aktin-bindenden Domäne (Calponin homologe Bindungsdomäne (CH)) und einer Mikrotubuli-bindenden Stelle, welche mit der des GAS2 verwandt ist (Sun et al. 2001). Somit stellt das GAS2L1-Protein eine Verbindung zwischen Mikrotubuli und Mikrofilamente dar.

Das *hGAR22* Gen kodiert zwei alternative Splicingvarianten (Zucman-Rossi et al. 1996). Zum einen wird die  $\alpha$ -Form (ca. 1000bp) und einem daraus resultierendem Protein mit 337 Aminosäuren exprimiert; zum anderen die  $\beta$ -Form (ca. 2000bp) und

## Einleitung

einem dementsprechend längeren Protein mit 681 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 72,6 kDa (**Abbildung 5**).



**Abbildung 5: Isoformen des humanen sowie murinen *GAS2L1* (*hGAR22*) und dessen Domänen.** Die Splicingvarianten  $\alpha$  und  $\beta$  unterscheiden sich durch das Exon 5B (EX5B), wobei die kürzere  $\beta$ -Isoform das längere Protein kodiert. Beiden Formen zeichnen sich durch die Calponin homologer Bindung (CH) und die GAS *related* Sequenz (GAR) aus (Goriounov *et al.* 2002).

Dabei ähneln sich die ersten 334 Aminosäuren nicht nur bei den beiden Isoformen stark, sondern sind auch homolog zu anderen *GAS2*-verwandten Genen wie dem *GAS2 related Protein* auf Chromosom 17. Die restlichen Aminosäuren der  $\beta$ -Isoform hingegen haben keine bekannten Funktionen oder korrelierende Strukturen zu anderen Proteinen (Goriounov *et al.* 2003).

Humanes *GAS2L1* und murines *GAS2L1* (*mGAS2L1*) besitzen eine hohe Homologie auf mRNA-Ebene (89% bei der  $\alpha$ -Form und 86% bei der  $\beta$ -Form). Sie sind evolutionär konserviert und in ihrer Funktion erhalten. Die  $\alpha$ -Isoform des Proteins scheint *in vitro* im Zytoplasma und in Verbindung mit Aktin exprimiert zu sein, jedoch keine Verbindung mit den Mikrotubuli einzugehen. Obwohl die mRNA ubiquitär nachgewiesen wurde, konnte in Mäusen keine natürliche Expression des *GAS2L1* $\alpha$  Proteins gefunden werden.

Währenddessen bindet die  $\beta$ -Isoform sowohl Aktinfilamente als auch Mikrotubuli und scheint diese zu stabilisieren. Diese Isoform konnte in fast allen Zelltypen mRNA

nachgewiesen werden, wobei mGAS2L1 $\beta$  Protein bisher nur in Hoden und Hirn in geringen Mengen nachgewiesen werden konnte (Goriounov et al. 2003).

Im Gegensatz zu GAS2 wurde bei GAS2L1 $\beta$  eine Phosphorylierung am C-terminalen Ende im G<sub>0</sub>-Stadium beschrieben, was auch auf einen funktionellen Unterschied zwischen beiden Proteinen hinweist (Goriounov et al. 2003).

Unbekannt hingegen sind die genauen Wege der Gen- bzw. Proteinregulation für GAS2L1 in den meisten Zelltypen, darunter auch in Podozyten. Bisher ist in der Literatur eine Steigerung der *GAS2L1* mRNS-Expression in erythropoetischen Stammzellen unter dem Einfluss des Thyroidhormons und des dazugehörigen Rezeptors beschrieben (Gamper et al. 2009). Es wird dort der Aktivierungsweg über das basic transcription element binding protein 1/Krüppel-like factor 9 (BTEB1/KLF9) vermutet. Bei Überexpression von GAS2L1 in erythropoetischen Zellen wurde eine längere Dauer des Zellzyklus gemessen, jedoch keine Rückkopplung auf die Genexpression nachgewiesen (Gamper et al. 2009).

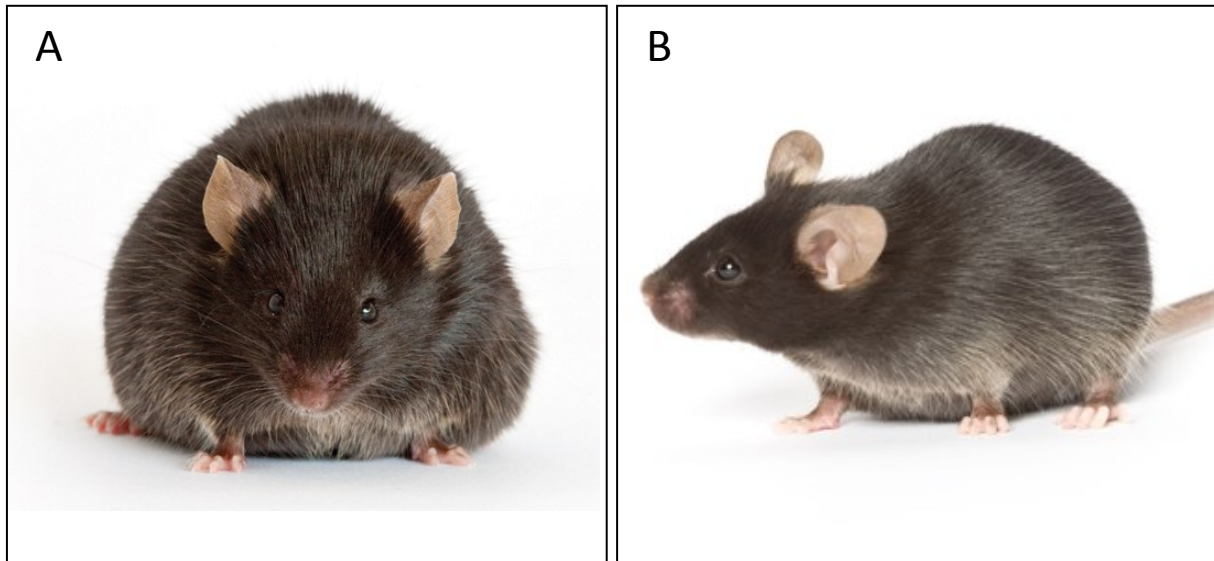
Für Podozyten gibt es bis jetzt keine solchen konkreten Erkenntnisse hinsichtlich der Regulation oder Funktion.

### 2.6. Mausmodell für den *Diabetes mellitus* Typ 2

1966 wurde ein erstes Mausmodell für den Typ 2 *Diabetes mellitus* entwickelt (Hummel et al. 1966). Diese sogenannte *db/db* Maus ist eines der am häufigsten genutzten Tiermodelle für diese Erkrankung. Die *db/db*-Tiere besitzen einen autosomal rezessiven Defekt im Leptinrezeptor, hervorgerufen durch eine Punktmutation im *db*-Gen. Eine homozygote Mutation für dieses Gen resultiert in einer gestörten Leptinregulation und nachfolgend in Fress- und Fettsucht mit konsekutiver Hyperlipidämie (**Abbildung 6**). Daraus folgt eine Insulinresistenz wie sie auch beim Menschen beobachtet werden kann. Es entwickelt sich eine Hyperinsulinämie und schlussendlich Diabetes mellitus Typ 2 inklusive der Langzeitnebenwirkungen, wie der DN. Der verwendete Mausstamm C57BL/6J (Black 6) ist ein durch Rückkreuzung aus dem ersten diabetischen Stamm C57BLKS/J (Black Kaliss) gezüchteter Stamm, der sich von diesem vor allem in einer kürzeren Latenzzeit bis zur Ausprägung der Symptome von etwa 12 Wochen unterscheidet. (Tesch und Lim 2010). Als zugehörige Kontrolltiere werden die heterozygoten *db/m*-Mäuse verwendet. Diese zeigen zwar nicht den absolut gleichen Phänotyp wie die

## Einleitung

Wildtiere, haben also geringfügig höheres Gewicht als diese, entwickeln jedoch keinen Diabetes und werden deshalb als Vergleichsstandard verwendet.



**Abbildung 6: Phänotypen des Leptinrezeptordefekts.** (A) Homozygote Mutation (*db/db*), (B) Wildtyp (nach The Jackson Laboratory 2013)

### 3. Zielstellung

- In unserer Arbeitsgruppe wurden durch Differential Displays unterschiedliche Gene auf ihre Expression unter dem Einfluss von AGEs in terminal differenzierten Podozyten untersucht. Dabei wurden 188 Gene gefunden, welche in Podozyten hoch (111) bzw. herunter (77 Gene) reguliert waren. Von diesen Genen sind bis jetzt Neuropilin sowie NIPP1 (*Nuclear inhibitor of Protein Phosphatase 1*) ausführlich untersucht worden (Liebisch et al 2014). Zu ersteren Gruppe zählen auch die Zellzyklusarrest-Gene GAS2 und GAS2L1.
- Ziel dieser Arbeit war den Einfluss des AGE-BSAs auf die Genexpression von GAS2 und GAS2L1 auf Ebene der mRNA und Proteine in terminal differenzierten Podozyten zu analysieren. Die Abhängigkeit und Reversibilität dieses Prozesses sollte durch die Blockade des AGE Rezeptors RAGE mit einem anti-RAGE-Antikörper *in vitro* nachgewiesen werden. *In vivo* sollte in den Nieren diabetischer (*db/db*) Mäuse und den entsprechenden Kontrolltieren (*db/m*-Mäuse) die *in vitro*-Daten überprüft werden. Dabei sollte die genaue Verteilung der Genprodukte in den Podozyten über *in Situ* Hybridisierung analysiert werden.
- Die Proteinexpression von GAS2 in terminal differenzierten Podozyten unter Zugabe von AGE-BSA sollte in Western Blots und über immunhistochemische- und Immunfluoreszenzfärbung untersucht werden. Immunhistochemie und Immunfluoreszenz dienten ebenfalls der Analyse der GAS2-Proteinexpression *in vivo*.
- Die Überexpression von GAS2L1 sollte eine mögliche Induktion von Apoptose und die Einflüsse auf das Zytoskelett zeigen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller
100bp DNS Leiter, äquimolar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/Bis-Lösung (37,5:1), 30% (w/v)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA), Fraktion V	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Gallen, Schweiz
Camphothecin	Sigma-Aldrich, St. Gallen, Schweiz
Complete Lysis M Puffer	Roche, Mannheim, Deutschland
Denhardt's Lösung	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EcoRI	New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland
Ethidium Bromide Solution (10mg/ml)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
GoTaq Green Master Mix	Promega, Mannheim, Deutschland
Kaisers Glycergelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS steril	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad, München, Deutschland
Roti®-Free Stripping Puffer	Roth Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T.™	Sakura® Finetek Europe B.V. KvK, Leiden, Niederlande
Tween®20, reinst	Serva, Heidelberg, Deutschland
XhoI	New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland

**Tabelle 1:** Allgemeine Chemikalien und Reagenzien

#### 4.1.2. Kits und Hilfsmittel

Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA
Caspase Glo® 3/7 Assay	Promega, Mannheim, Deutschland
DAB-Substrate Kit for Peroxidase	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche, Mannheim, Deutschland
Western Lightning™ Plus ECL	Roche, Mannheim, Deutschland
NucleoSpin® Tissue	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Lipofectamin plus	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Ligation Kit	New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland
Lightcycler FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> SYBR Green	Roche, Mannheim, Deutschland
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QiaShredder	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Vectastain ABC Kit (Goat-IgG)	Linaris, Dossenheim, Deutschland

**Tabelle 2:** Kits und Hilfsmittel

#### 4.1.3. Zellkulturmedien und Zusätze

Produkt	Firma
Accutase	PAA, Cölbe, Deutschland
Fötale Kälber Serum (FKS)	Lonza, Köln, Deutschland
Interferon $\gamma$	Invigate, Jena, Deutschland
RPMI 1640+GlutaMAX™	Gibco (Invitrogen), Darmstadt Deutschland
Streptomycin/Penicillin	Sigma Aldrich, St. Gallen, Schweiz

**Tabelle 3:** Verwendete Zellkulturmedien und deren Zusätze

#### 4.1.4. Antikörper

Primäre Antikörper	Firma
Goat anti mGAS2 IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Rabbit anti Synaptopodein (SE-19) IgG	Sigma Aldrich, St. Gallen, Schweiz
Rabbit anti RAGE (N16) IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Mouse anti $\beta$ -Aktin Clone AC-15 IgG	Sigma Aldrich, St. Gallen, Schweiz
Anti-Digoxigenin (DIG-)	Roche, Mannheim, Deutschland
Anti c-Myc monoclonal	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Sekundäre Antikörper	
Donkey anti Goat-IgG Alexa 448	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Donkey anti Goat-IgG Alexa 568	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Donkey anti Rabbit-IgG Alexa 448	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Goat anti Mouse-IgG HRP-gekoppelt	KPL, Gaithersburg, Maryland, USA
Rabbit anti Goat-IgG HRP gekoppelt	KPL, Gaithersburg, Maryland, USA

**Tabelle 4:** Verwendete Antikörper

#### 4.1.5. Primer

Für das Primerdesign wurde auf der Gensequenz-Internetdatenbank der NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)) nach den entsprechenden murinen Genen gesucht und mit Hilfe von BLAST-Primer Generator die entsprechenden Primer entworfen.

Primer	Sequenz (vom 5'- zum 3'-Ende)
<i>db/db</i> Forward*	AGA ACG GAC ACT CTT TGA AGT CTC
<i>db/db</i> Reverse*	CAT TCA AAC CAT AGT TTA GGT TTG TGT
GAS2 Forward	TCT TCA TCA GGA TGC TGC AC
GAS2 Reverse	AGC CTT GTA GGT GGC AGA GA
GAS2L1 $\alpha$ Forward	CAG TGA CTC CAC TGG CTC TG
GAS2L1 $\alpha$ Reverse	GAA CTT TTC CCA GGG TGT GA
GAS2L1 $\beta$ Forward	TTA CTG CGC CTC AGT TTC CT
GAS2L1 $\beta$ Reverse	AAA AAC AGG AGC TGG AGC AA
GAS2L1 PCR (200bp) Forward	TGT GCC AAC ATG CCA ACG CTG
GAS2L1 PCR (200bp) Reverse	GTC CTC TGT CTC AAA CAT GAG



## Material und Methoden

GAPDH Forward	TGT CAG CAA TGC ATC TGG CAG GTT
GAPDH Reverse	GAT GTC ATC ATA CTT GGC AGG TT
M13 Primer Forward**	GTA AAA CGA CGG CCA G (Roche)
M13 Primer Reverse**	CAG GAA ACA GCT ATG AC (Roche)

**Tabelle 5:** Verwendete Primer und deren Sequenzen

Alle Primer stammen von der Firma Invitrogen, außer \* von TIB MolBiol und \*\* von Roche.

### 4.1.6. Puffer und Lösungen

1x PSB (pH 7,4):	0,02 % 0,8 % 0,024 % 0,144 % Einstellen mit Salzsäure/ Natronlauge auf pH 7,4.	KCl NaCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1x TBS:	0,1 M 0,15 M	Tris pH 7,5 NaCl
Proteinlysepuffer: Complete lysis M Puffer von Roche (10 ml):	1 Tablette 0,1 % 1 mM 2 %	Complete M Puffer (Roche) Aproteine PMSF Orthovanadat
Hypotonischer Proteinlysepuffer (10 ml):	1/2 Tablette 15 mM 2 mM 10 mM 0,1 mM 0,15 % 0,1 mM 0,5 mM	Complete M Puffer (Roche) TRIS pH 7,9 MgCl KCl EGTA NP-YO EDTA PMSF
Zellkernextraktproteinlysepuffer (10 ml):	20 mM 0,4 M 1 mM 0,1 % 5 mM 0,5 mM 0,5 mM 10 % 1 Tablette	TRIS pH 7,9 NaCl MgCl NP-YO EDTA PMSF Dithiothreitol (DTT) Glycerol Complete M Puffer (Roche)
Kathodenpuffer:	0,3 % 0,53 % 20 %	Tris ε-Aminocapronic Säure Methanol
Anodenpuffer:	3,6 % 20 %	Tris Methanol
SDS-PAGE Gel 12 % (Trenngel)	12 % 0,375 M 0,1 % 0,1 % 0,1 %	Acrylamid Tris (pH 8,8) SDS Ammoniumpersulfat TEMED.
Sammelgel	4 % 0,375 M 0,1 % 0,133 %	30 % Acetylamid Bis Mix Tris-HCl (pH 6,8) SDS 10 % Ammoniumpersulfat

## Material und Methoden

	0,1 %	TEMED
5x SDS-Proben Puffer	0,25 M 50 % 5 % 0,25% 10 %	Tris-HCl pH 6,8 Glycin $\beta$ -Mercaptoethanol Bromphenolblau SDS
SDS Laufpuffer:	0,025 M 1,5 % 0,1 %	Tris Glycin SDS
TBE Puffer (pH 7):	1,08 % 0,55 % 2 mM Einstellen mit Salzsäure/ Natronlauge auf pH 7.	TRIS Base, Borsäure EDTA- $\text{Na}_2$
1,2 % Agarosegel	1,2 % 0,005 %	Agarose in TBE Puffer Ethidiumbromid
Citratpuffer für <i>antigene retrieval</i> :	82 mM 180 mM	Natriumcitrat, Citronensäure
DEPC Wasser:	0,1 %  Anschließend zweifach autoklavieren	Diethylpyrocarbonat (DEPC) in doppelt destilliertem Wasser
Saline-Sodium Citrat (SSC) Puffer (20x, pH 7):	3 M 0,34 M 0,1% Einstellen mit Salzsäure/ Natronlauge auf pH 7.	NaCl Natriumcitrat DEPC
10x Salzlösung für ISH :	3 M 0,1 M 0,1 M 50 mM 10 %	NaCl Tris-HCl, pH 7,5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6,8 EDTA pH 8,0 Denhardts Lösung
<i>In Situ</i> Hybridisierungspuffer:	50 % 10 % 1 % 20 % 19 %	Formamid 10x Salzlösung für IHS t-RNS Dextransulfat DEPC Wasser
Blockierlösung für ISH	0,5 % 99,5 % Kurzes Erwärmen zum besseren Lösen	Blocking Reagenz (Roche) TBS (steril)
Detektionspuffer für ISH	5 % 0,1 M 50 mM 0,5%	Tris HCl pH 9,5 NaCl $\text{MgCl}_2$ DEPC
Blockierlösung für IHC:	98,33% 1,67 %	PBS, steril Rabbit-Serum von Vectastain
LB Nährmedium für <i>E.coli</i> (pH 7)	0,5 % 1 % 0,2 % Einstellen mit Salzsäure/ Natronlauge auf pH 7 1,5 % einmalig Autoklavieren 0,01 %	Hefeextrakt Trypton NaCl Agarose Ampicillin

**Tabelle 6:** Verwendete Puffer und Lösungen

### 4.1.7. Bakterien und Plasmide

Für die Transformation wurden E.coli Bakterien (One Shot® TOP10F competent E.coli, Invitrogen) verwendet.

Folgende Plasmide wurden genutzt:

Für die *in vitro* Transkription wurde der pCR II-TOPO Vektor von Invitrogen genutzt.

Für die Überexpression wurde ein pCMV-myc-Plasmid von Invitrogen verwendet.

Zur Optimierung der Transkription wurde ein GFP-Plasmid von Invitrogen verwendet.

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Herstellung von AGE-BSA und Kontroll-BSA

Für die Herstellung von AGE-BSA bzw. Kontroll-BSA wurden 5 % BSA (in 1x sterilem PBS) auf einen pH 7,4 eingestellt und mit CuSO<sub>4</sub> als Katalysator versetzt (Endkonzentration 4 mM). Für das AGE-BSA wurde 43,2 g D(+)-Glukose auf 500 ml (entspricht 500 mM) zugesetzt. Beide Lösungen wurden steril filtriert und in 50 ml Falcons für 60 Tage bei 37°C in Dunkelheit inkubiert. Die Fluoreszenz der Substanzen wurde mit dem „infinite Reader M200“ von Tecan bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 420 nm überprüft.

Die Ansätze wurden anschließend gegen 0,5 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung dialysiert um die Restglukose zu entziehen und die Lösung anschließend lyophilisiert. Der Pentosidin- und CML-Gehalt der Lösungen wurde via HPLC-Assay bzw. ELISA bestimmt.

AGE-BSA bzw. Co-BSA wurden in einer Arbeitskonzentration von 5 mg/ml in 0,1% Fötale Kälber Serum (FKS) in RPMI Medium den Podozyten für 24 Stunden zugegeben. Diese Bedingungen wurden in der Arbeitsgruppe in zahlreichen Vorversuchen ermittelt und etabliert. Weitere Kontrollbehandlungen waren die Inkubation mit 10% FKS in RPMI 1640 oder 0,1% FKS in RPMI 1640.

### 4.2.2. Zellkultur

Podozyten sind die epithelialen Zellen des Glomerulus. Als *in vitro* Modell wurden terminal differenzierte Podozyten nach einem im Labor etabliertem Protokoll von Professor Dr. Mundel verwendet (Mundel et al. 1997). Dabei wurden immortalisierte Podozyten zunächst bei 33 °C im RPMI 1640 unter Zugabe von 8%-igen,

hitzeinaktiviertem FKS, 100U/ml Penicillin/Streptomycin und 50 U/ml Interferon  $\gamma$  inkubiert. So werden die undifferenzierten Podozyten durch das temperatursensitive SV-40 T large Antigen und das Interferon  $\gamma$  in einem permissiven Stadium gehalten. Zur Induktion der Differenzierung wurde bei jeder dritten Zellpassage das Interferon um 10 U/ml gesenkt. Zuletzt wurden die Podozyten mit 10% FKS und Antibiotika, ohne Interferon  $\gamma$ , bei 37°C ausdifferenziert, bis das podozytenspezifische Synaptopodin als Differenzierungsmarker immunhistologisch nachweisbar war.

Die Zellen wurden in RPMI 1640 bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> unter Zugabe von 10 % steriles FKS in einem Inkubator von Heraeus Sepatech GmbH (Heracell150 i CO<sub>2</sub>) gezüchtet.

Zum Umsetzen wurden die Podozyten mit Accutase bei 37°C inkubiert und bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Medium resuspendiert, die Zellen ausgezählt und entsprechend in neue Kultivierungsgefäße ausgesät.

Als Standard wurden die Podozyten für 24 Stunden in RPMI 1640 mit 10% FKS und Antibiotika anwachsen gelassen. Vor der eigentlichen Behandlung der Zellen wurden die Podozyten über Nacht in RPMI 1640 mit 0,1% FKS zur Synchronisation des Zellzyklusstatus inkubiert.

Für die Analysen wurden die Podozyten in folgender Zellzahl ausgesät:

	Zellzahl
6-Well Platte	250'000 pro Well
8cm-Platte	1'000'000
4-Well Slide	20'000 pro Well

**Tabelle 7:** Verwendete Zellzahl

### 4.2.3. Blockierung des AGE Rezeptors RAGE

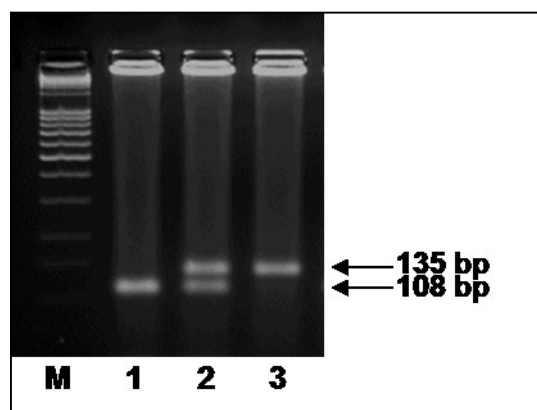
Um die optimalen Bedingungen für die Blockade von RAGE zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe des anti-RAGE-AK verwendet. Dies sollte eine gute Blockierung des Rezeptors bei geringen unerwünschten Effekten des AK als solchen ermöglichen. Dafür wurden Podozyten nach den oben genannten Verfahren in 6-Well-Platten für die mRNS- Gewinnung oder in 8 cm-Zellkulturplatten für die Proteinbestimmung ausgesät und entsprechend behandelt. Der anti-RAGE-AK wurde den Zellen bereits in der 24-stündigen serumfreien Phase in Verdünnungen von 1:15'000, 1:10'000 bzw. 1:5'000 zugesetzt. Die Podozyten wurden anschließend mit Co-BSA, AGE-BSA bzw. Co-BSA/AGE-BSA und der entsprechenden Verdünnung des anti-RAGE-AKs inkubiert.

#### 4.2.4. Genotypisierung der diabetischen Mäuse

Zur Bestimmung des Genotyps der Tiere vom Typ B6.Cg-Dock7m LepRdb/+/J wurde die genomische DNS verwendet. Diese wurde aus den Mäuseschwanzbiopsien mit Hilfe des NucleoSpin® Tissue Kits nach dem entsprechenden Herstellerprotokoll isoliert und die Konzentration bei 260 nm im Nanodrop gemessen. Die Amplifikation von 1 µg DNS erfolgte nach über semiquantitative PCR. Der Mastermix setzte sich aus 10 µl SYBR Green, je 1 µl db-forward und reverse Primer und 8 µl Aqua dest zusammen. Das PCR-Programm war wie folgend: 94°C Denaturierung (30 s), Primer-Anlagerung bei 52°C (45 s) und Elongation bei 72°C (45 s), 35 Zyklen.

Dem gesamten Produkt wurde darauf 1 µl RsaI und 4 µl Puffer zugesetzt und über Nacht bei 37°C verdaut. Nach Abstoppen der Verdaureaktion bei 4°C wurden die Genprodukte dieser bei 40 mV in einem 3%-igem Agarosegel aufgetrennt.

Die Auswertung unter UV-Licht zeigte für jedes *db*-Allel eine verkürzte, ca. 108 bp lange Bande, für jedes Wildtyp-Allel hingegen eine ca. 135 bp große Bande (**Abbildung 7**).



**Abbildung 7: Genotypisierung der Mäuse.** (1) *db/db*-Maus, (2) *db/m*-Maus, (3) Wildtyp-Maus, (M) DNS Leiter

#### 4.2.5. Analyse von *db/db* Mäusen

Es wurden Mäuse vom Typ B6.Cg-Dock7m LepRdb/+/J (The Jackson Laboratory, Maine, USA) verwendet. Diese wurden zwischen der 14. und 16. Lebenswoche mit Diethylether betäubt und durch Genickbruch getötet. Das Vollblut wurde zur Bestimmung eines kleinen Blutbildes (Hämatokrit, Hämoglobin-Konzentration, MCV, MCH) entnommen, Blutplasma für weitere Untersuchungen gewonnen und bei -80°C gelagert. Die beiden Nieren wurden entnommen und entlang der Pole und des Hilus

halbiert. Je eine halbe Niere wurde für die Gewinnung der Gesamt-RNA bzw. Protein, für die Kryofixation (in TissueTek®) und zur Fixierung und Paraffinierung verwendet.

Für die Einbettung in Paraffin wurden die Nieren für 24 Stunden in 3,7% Formaldehyd fixiert und dann für 2 Stunden gewässert. Die Proben wurden über Nacht in der Histokinette (Leica TP 1020) entwässert und paraffiniert (je eine Stunde in 50%-igem, 70%-igem, zweimal 96%-igem, dreimal reinem Ethanol, zweimal 4 Stunden Xylol, zweimal 2 Stunden in 56°C flüssigem Paraffin). Nach dem Einbetten in Paraffinblöcke wurden die Nieren mit dem Rotationsmikrotom (Leica RM 2165) geschnitten und 5 µm dicke Querschnitte hergestellt.

### **4.2.6. RNS Gewinnung**

Nach dem Ablauf der 24-stündigen Inkubationszeit der jeweiligen Medien wurden die Podozyten einmal mit sterilem PBS gewaschen und dann mit dem 600 µl RLT-Lysepuffer (Qiagen) plus 1 % β-Mercaptoethanol versetzt. Mit sterilen Zellschabern wurden diese zuerst gelöst. Das RNeasy Kit zum Aufreinigen der Gesamt-RNS wurde nach Herstellerprotokoll verwendet und die Proben in 20 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration wurde mittels UV Spektrophotometrie bei 260 nm mit dem Nanodrop 2000 von Thermo Science, oder mit dem „Tecan infinite M200“ Mikroplattenleser bestimmt. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

### **4.2.7. cDNS Herstellung**

Die cDNS wurde aus je 1 µg Gesamt-RNS auf ein Volumen von 25 µl mit Wasser verdünnt. Dazu wurde 2,5 µl oligo-dT-Nukleotid (18 Desoxythymidin) und 2,5 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) gegeben und dieser Mix für 5 Minuten bei 65°C zur Primerhybridisierung inkubiert. Im Anschluss wurden 2,5 µl Reverse Transkriptase, 10 µl 5x Reverse Transkriptase Puffer sowie 5 µl DTT und 2,5 µl RNase-Inhibitor hinzugefügt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Abschließend wurde die Enzyme bei 75°C für 15 Minuten inaktiviert und damit die Reaktion gestoppt.

#### 4.2.8. Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

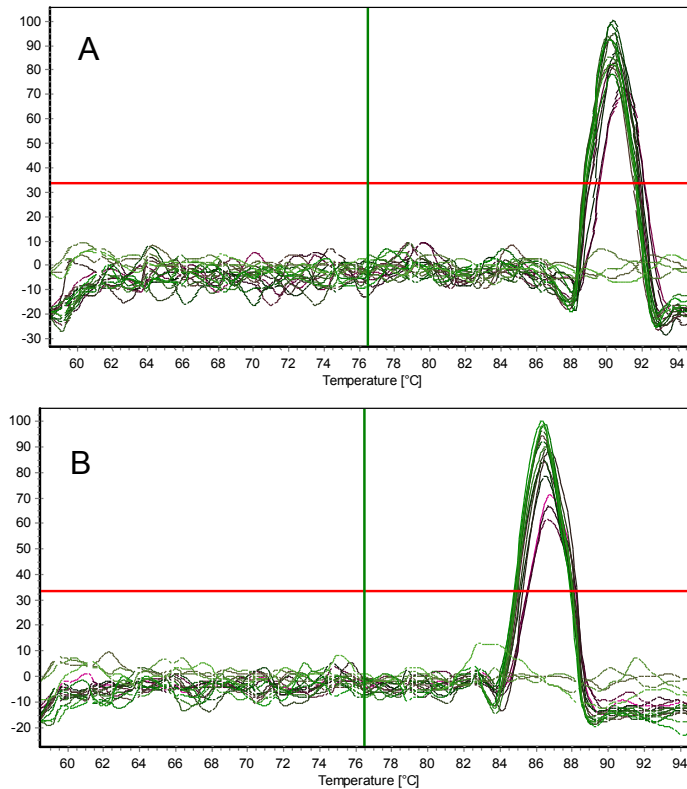
Für die Semiquantitative PCR wurde je 1 µl der cDNA verwendet. Diese wurde mit je 1 µl Forward Primer, Reverse Primer sowie 10 µl GoTaq Mix von Promega versetzt und mit destilliertem Wasser auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

Durchgeführt wurden die PCRs im T<sup>3000</sup> Thermocycler von Biometra nach folgendem Programm: 3 Minuten Denaturierung bei 95°C, gefolgt von 35 Zyklen Denaturierung (95°C, 45 Sekunden), Primeranlagerung (58°C, 45 Sekunden) und Elongation (72°C, 60 Sekunden, für die Gesamt-DNS von GAS2L1 $\alpha$  180 s und die Gesamt-DNS von GAS2L1 $\beta$  90 s). Zum Abschluss erfolgte eine letztmalige Elongation von 5 Minuten bei 72°C.

Die Proben wurden dann in einem 1,2% Agarosegel in TBE Puffer aufgetrennt. Als Maßleiter wurde der 100 bp DNS Leiter von Roth verwendet.

#### 4.2.9. Real Time PCR

Zur Quantifizierung der mRNS -Level wurden Real Time PCRs genutzt. Dazu wurden für jeden Ansatz (mit AGE-BSA, mit Co-BSA, mit und ohne RAGE-Blockierung) mindestens sechs verschiedene Proben cDNS gewonnen, wie unter 4.2.6 und 4.2.7 beschrieben. Für die *in vivo* Versuche wurden gesamt-RNS aus Gesamtnierenlysaten von *db/db* Mäusen und *db/m* Mäusen hergestellt. Die daraus gewonnene cDNS (1 µl) wurde mit je 100 pmol Forward- und Reverse-Primer, 4 µl *Lightcycler FastStart DNA Master*<sup>PLUS</sup> SYBR Green und 14 µl A. dest. DNase frei versetzt. Die PCR wurde in einem „Mastercycler® ep realplex“ von Eppendorf nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Es lief parallel zu der Analyse der mRNS-Gehalte von *GAS2L1* und *GAS2* die Messung der Transkriptakkumulation des Haushaltsgenes GAPDH. Es wurden 35 Zyklen Denaturierung (95°C, 45s), Primerhybridisierung (58°C, 45s) und Elongation (72°C, 45s) zum Amplifizieren und Messung des Schwellenwert Zyklus (*threshold cycle*, C<sub>T</sub>) angesetzt. Abschließend wurde eine Schmelzkurve generiert (**Siehe Abbildung 8**).



**Abbildung 8: Schmelzkurven der Real Time PCR Produkte.** GAS2L1 (A) und GAS2 (B).

Um die Expression der Gene im Verhältnis zu GAPDH und den Gruppen AGE-BSA bzw. Co-BSA zu ermitteln wurde die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewendet (nach Livak und Schmittgen 2001) und wie folgend berechnet (hier am Beispiel für GAS2):

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$R = 2^{-(\Delta C_{TAGE-BSA} - \Delta C_{TCO-BSA})}$$

$$R = 2^{-((C_{TGAS2} - C_{TGAPDH})_{AGE-BSA} - (C_{TGAS2} - C_{TGAPDH})_{CO-BSA})}$$

Die Expression von *GAS2L1* und *GAS2* wurde aus zwei unabhängigen Wiederholungen mit je 6 Proben mit AGE-BSA bzw. Co-BSA behandelten Podozyten cDNS bestimmt.

### 4.2.10. Plasmid- und Sondenherstellung

Zur Durchführung der *in situ*-Hybridisierung und der Überexpression mussten die entsprechenden Plasmide zur Herstellung der Sonde bzw. zur Transfektion mit den Genen *GAS2L1* und *GAS2* generiert werden.

Dazu wurde zuerst eine 200bp-Sonde des *GAS2L1* $\alpha$  aus der Gesamt-cDNS mittels PCR in einem 5-fachen Ansatz amplifiziert. Die Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechende 200 bp-Bande mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit aufgereinigt, und das *GAS2L1*-Fragment in den TOPO TA Vektor (pCRII-TOPO)

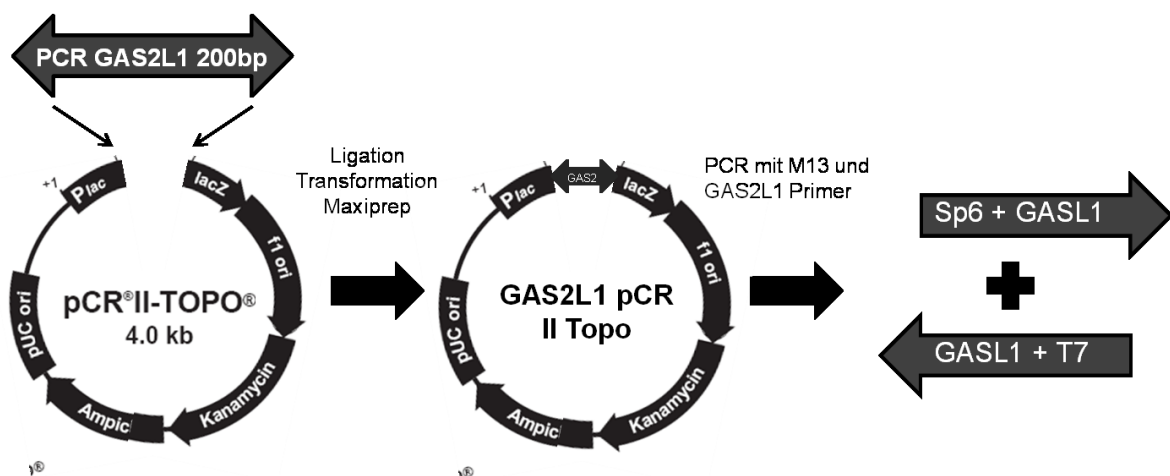


nach Herstellerprotokoll ligiert. Die Transformation von 50 µl *E. coli* kompetenten Zellen (One Shot® TOP10F, Invitrogen) mit 1 µl des Plasmid erfolgte unter Hitzeschock (45 Sekunden bei 42°C). Die transformierten Zellen wurden eine Stunde in 500 µl LB-Nährmedium ohne Antibiotikum bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Suspension auf Agarplatten (mit 0,1% Ampicillin und 40 µl X-Gal) ausplattiert. Die Zugabe von X-Gal diene der Selektion der *GAS2L1* $\alpha$ -negativen Klone, welche aufgrund eines noch intakten *lacZ* Gens im Plasmid blau färben. Nach 24 Stunden wurden die positiven, weißen Kolonien auf der Agarplatte in eine LB-Flüssigkultur überführt und weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert, um eine Vermehrung der Einzelkolonie zu ermöglichen. Die Plasmid-DNS wurde anschließend mit dem Plasmid *Plus* Midi Kit von Qiagen isoliert.

Die Orientierung der Sonde wurde in einer PCR über den Einsatz von M 13 Forward oder Reverse Primern in Kombination mit den jeweiligen Primern für *GAS2L1* getestet. Eine PCR mit den *GAS2L1* spezifischen Primern diene als zusätzliche Kontrolle. Aus den Plasmiden wurde mit einem großen Ansatz PCR mit dem *GAS2L1* Forward Primer und dem M13 Forward Primer das für die Sonde wichtige Fragment amplifiziert. Das Produkt wurde in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt, erneut mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit aufgereinigt und die Konzentration der DNS bestimmt.

Bei der Herstellung der Sonde für *GAS2* (200bp) wurde äquivalent verfahren.

Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs zeigt **Abbildung 9**:



**Abbildung 9: Schematische Darstellung des Plasmids zur Herstellung der Sonde für die ISH von *GAS2L1* Gen.** In einen pCR®II-Topo® wurde ein 200bp langes, aufgereinigtes Fragment der *GAS2L1*-cDNS ligiert, in *E. coli* transformiert und das Plasmid gewonnen. Nach der Bestimmung der Orientierung des Fragmentes, wurden die Sonden mittels PCR amplifiziert und später *in vitro* mit Sp6 bzw. T7 transkribiert (Siehe 4.2.11).

#### 4.2.11. *In-situ* Hybridisierung

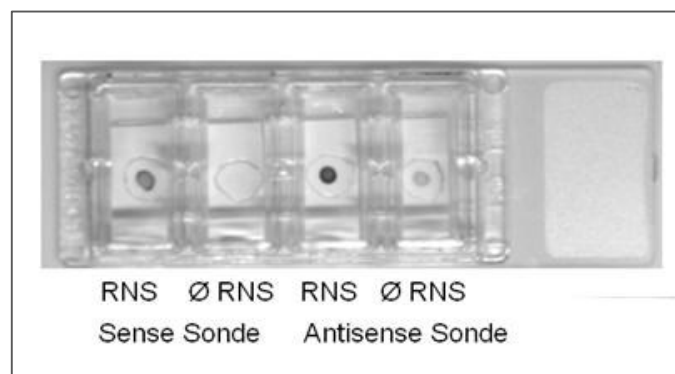
Um die Expression der *GAS2L1 $\alpha$* - und der *GAS2*-mRNS unter verschiedenen Behandlungen darzustellen, wurde eine *in situ* Hybridisierung (ISH) durchgeführt.

Die Sonden wurden wie unter 4.2.10 beschrieben, hergestellt.

Für die *in vitro* Transkription wurde das *DIG RNA Labeling Kit* von Roche verwendet. Dafür kamen 200 ng der in der PCR amplifizierten Sonde, 2  $\mu$ l Transkriptionspuffer (10fach Puffer), 0,5  $\mu$ l RNase Inhibitor, 2  $\mu$ l RNA SP6-Polymerase (für Sense-Sonde, T7-Polymerase für Antisense Sonde), 2  $\mu$ l DIG-RNA *labeling* Mix (inklusive dNTPs) zum Einsatz. Der Ansatz wurde mit DEPC Wasser auf 20  $\mu$ l aufgefüllt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion in einem 1,5 %-igen, RNase-freien Agarosegel überprüft. Es wurde keine alkalische Hydrolyse durchgeführt, da die Sonden mit 200 bp ausreichend groß waren.

Die RNS Konzentration der Sonden wurden mit dem Nanodrop gemessen.

Die ISH-Sonden wurden unter Verwendung der aufgereinigten Gesamt-RNS aus den Podozyten im Dot-Blot auf ihre Funktionalität getestet. Dazu wurde jeweils 1  $\mu$ l mRNS auf die RNS-Blot Membran (Nitrocellulose Membran 0,2  $\mu$ m Biorad) aufgetragen und eine Minute im UV-Licht fixiert. Die darauffolgenden Schritte erfolgten wie in der eigentlichen ISH nach dem im folgenden Absatz beschriebenen Protokoll. Die Membran wurde mit 200 $\mu$ l Hybridisierungspuffer und 1  $\mu$ l der Sonde versetzt und 4 Stunden bei 55°C inkubiert. Nach Waschschritten mit SSC-Puffer wurden diese wurde dann mit dem Digoxigenin (DIG)-Antikörper von Roche markiert und mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/ 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (NBT/BCIP) gefärbt (**Abbildung 10**).



**Abbildung 10: Dotblot zur Testung der Sonden für *GAS2L1*.** Testung der jeweiligen Sense- (Revers) und Antisense-Sonden (Forward) unter Verwendung der Gesamt mRNS aus Podozyten.

## Material und Methoden

Für die ISH wurden je 20'000 Podozyten pro Loch in 4-Well-Chamber Slides ausgesät und entsprechend mit AGE-BSA und Co-BSA behandelt.

Die *in-situ* Hybridisierung wurde über drei Tage durchgeführt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit 3,7% Formaldehyd in PBS für 15 Minuten fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und sterilem Wasser wurden die Zellen für 15 Minuten in 0,1 M HCl inkubiert.

Eine Acetylierung mit 200 µl 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) und 0,5 µl Acetanhydrid (0,25%) für 20 Minuten wurde nach einem erneuten PBS-Waschschritt vorgenommen. Die Proben wurden mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 Minuten 70%-igen, 2 Minuten 80%-igen, 2 Minuten 96%-igen Ethanol) dehydriert. Danach wurden sie für 30 Minuten bei RT getrocknet.

Pro 1 ml Hybridisierungspuffer wurden 2 µl entweder Sense- oder der Antisense-Sonde zugegeben und der Ansatz für 8 Minuten bei 65°C denaturiert. Je 200 µl eines Puffer-Sonden Gemisches (Sense- oder Antisense-Sonde) wurde pro Well der chamber slides verwendet und diese über Nacht bei 55° in einer feuchten Kammer hybridisiert.

Mit SSC-Puffer erfolgte am zweiten Tag eine Waschreihe (1x SSC Puffer 10 Minuten bei RT, 0,1x SSC Puffer für 10 Minuten bei RT, 0,2x SSC Puffer für 20 Minuten bei ca. 50°C im Wasserbad, 2x SSC Puffer für 10 Minuten bei RT). Darauf wurden die Proben für 5 Minuten in TBS gewaschen und dann eine Stunde in 0,5% ISH-Blockierlösung inkubiert. Nach dem Blockieren wurden die Podozyten mit 200 µl Digoxigenin (DIG)-AK in einer 1:1000 Verdünnung in ISH-Blockierlösung für 1,5 Stunden in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen mit TBS für 10 Minuten wurde der Detektionspuffer für 5 Minuten bei RT hinzugegeben. Danach wurde NBT/BCIP (Roche) 1:50 in Detektionspuffer verdünnt und je 200 µl davon auf die Proben für 48 Stunden bei 30°C in einer feuchten Kammer gegeben.

Nachdem eine entsprechende Färbung zu sehen war, wurde die Färbung durch zweimaliges Waschen mit DEPC Wasser abgestoppt. Die Proben wurden für eine Stunde unter dem Abzug getrocknet und dann die Objektträger mit Kaisers-Glyceringelatine eingebettet. Für die Analyse wurde das Axioplan Mikroskop und AxioVision Rel. 4 Software von Zeiss verwendet.

### **4.2.12. Proteinnachweis mit dem Western Blot**

Für den Nachweis der Proteinexpression wurden zum einen das Gesamtproteinlysate der Podozyten, zum anderen das Zellkern- und das Zytoplasmalysat verwendet.

#### *4.2.12.1. Proteinisolierung*

Die entsprechend behandelten Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit einmal mit PBS gespült und anschließend pro 8 cm Zellkultur-Platte 350 µl Proteinlysepuffer Complete lysis M (Roche Applied Science) hinzu gegeben. Die Lysate wurden für 3-5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden diese, inklusive der noch nicht gelösten Zellen, mittels Zellschabern aufgesammelt und bis zur anschließenden Zentrifugation bei 4°C für 30 Minuten bei 13'000 rpm auf Eis gestellt. Der Überstand wurde gesammelt, das Pellet verworfen. Die Proteinkonzentration wurde nach Zugabe von Bradford-Reagenz bei 590nm spektrophotometrisch bestimmt. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

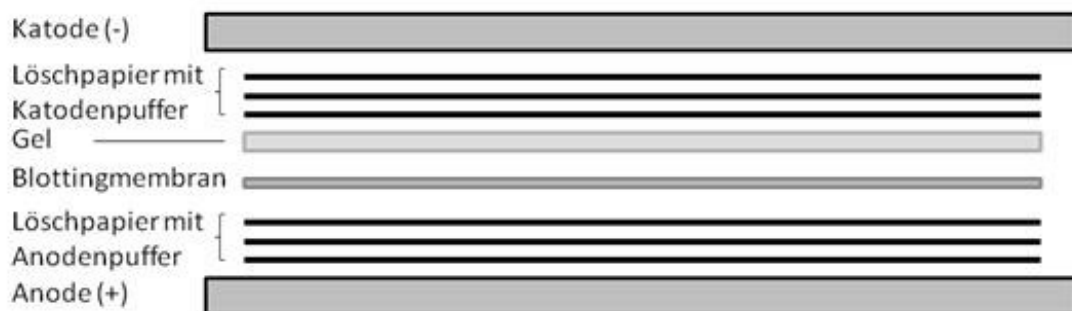
Für den Zellkernextrakt wurden die behandelten Zellen mit eiskühlem PBS gewaschen und dann mit 500 µl hypotonischem Lysepuffer für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das mit einem Zellschaber aufgesammelte Lysat wurde zur Zerkleinerung mehrmals durch eine 2,6 Gage Kanüle gesaugt. Das Gesamtlysate wurde dann bei 4°C für fünf Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde als Zytoplasmaprotein abgenommen, die Konzentration bestimmt und die Suspension bei -20°C gelagert. Das Pellet wurde erneut zweimal mit dem hypotonischen Lysepuffer gewaschen. Danach wurde es mit 50 µl Nuklear Extraktionspuffer 30 Minuten auf Eis inkubiert, gevortext, erneut bei 15'000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand als Kernextrakt gewonnen. Die Konzentration wurde bestimmt und die Proben bei -20°C gelagert.

#### *4.2.12.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese*

Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) wurden von den Proteinlysaten ein äquivalentes Volumen für 20 µg reines Protein verwendet und 1:5 mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Diese Proben wurden für 8 Minuten bei 95°C denaturiert und danach kurz anzentrifugiert. Für die SDS-PAGE wurden 12%-ige Tris-Glycin Gele verwendet. Die Proteine wurden bei 100 V für ca. 1,5 Stunden getrennt.

#### 4.2.12.3. Western Blot

Der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte über den *semi-dry*-Blot. Dazu wurden die in Methanol inkubierte Membran, das Gel, und 3 Lagen Whatman-Filterpapier in Kathodenpuffer und weitere 3 Lagen Whatman-Filterpapier in Anodenpuffer getränkt. Die Anordnung der Lagen erfolgte wie in **Abbildung 11** dargestellt. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde für 1 Stunde bei 18 V durchgeführt.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung des *semi-dry* Western Blot Aufbaus.**

Anschließend wurde die Membran kurz mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei RT mit 3% BSA in PBS/0,5% Tween 20 blockiert. Über Nacht wurde mit dem primären Anti-GAS2 AK in einer Verdünnung 1:1000 bei 4°C das Protein auf der Membran markiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,5% Tween20 wurde der sekundäre, HRP-gekoppelte Anti-Goat Antikörper in einer Verdünnung 1:2000 in 3%BSA in PBS/0,5% Tween für 45 Minuten zugegeben. Die Detektion erfolgte unter Verwendung einer ECL-Lösung und des LAS3000-Imager (Fuji Film, USA).

Als Ladekontrolle diente der Nachweis von  $\beta$ -Aktin (1:2000 AK-Verdünnung). Dazu wurde die Membran für eine Stunde in Roti®-Free Stripping Puffer gestrippt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,5% Tween20 wurde die Markierung und Detektion wie oben beschrieben wiederholt. Die Proteinabundanz wurde mit der Software ImageJ über den durchschnittlichen Grauwert der Banden bestimmt. Die Relation der GAS2-Werte zu der  $\beta$ -Aktin Ladekontrolle wurde auf die Mittelwerte der Co-BSA Proben normiert und damit die jeweiligen Proteinmengen ermittelt. Insgesamt wurden 14 Proben AGE-BSA behandelter Podozyten, 16 Proben Co-BSA, je 7 mit AGE-BSA oder Co-BSA und 1:10'000 anti-RAGE-AK, 5 nur mit anti-RAGE-AK, 7 nur in 0,1% FKS sowie 10 Proben mit 10% FKS in die Auswertung einbezogen.

#### **4.2.13. Immunhistochemischer Nachweis von GAS2-Protein**

Die Immunhistochemie wurde sowohl für Podozyten, als auch für *db/db* Mäuse durchgeführt. Es wurde sowohl eine Immunfluoreszenz als auch eine Färbung mit einem DAB-Farbstoff vorgenommen.

##### *4.2.13.1. Färbung der Podozyten über Immunhistochemie*

Die Podozyten wurden in *4-chamber slides* mit je 20.000 Zellen je Kammer ausgesät und wie unter beschrieben 4.2.2 behandelt.

Nach der 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen einmal vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und danach in 3,7% Formaldehyd/0,1% Triton X-100 für 30 Minuten fixiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurde die endogene Peroxidaseaktivität über die Behandlung der Präparate mit 0,3% Wasserstoffperoxidlösung unterbunden. Nach weiteren drei Waschriffen mit PBS für je fünf Minuten wurden die Zellen jeweils 10 Minuten mit Avidin /Biotin nach Herstellerangaben geblockt. Danach wurden die Präparate mit dem Goat-Vectastain Kit für 20 Minuten behandelt (zur Blockierung freier Bindestellen) und dem Anti-GAS2 Antikörper (1:200) für 60 Minuten bei RT inkubiert. Nach drei weiteren 5-minütigen Waschriffen mit PBS wurden die Zellen für 30 Minuten mit dem sekundären, biotinilierten AK in IHC-Blockierlösung inkubiert und daraufhin wieder für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann 15 Minuten mit Vectastain ABC Lösung behandelt und einmalig mit PBS gewaschen.

Für den Nachweis von GAS2-Protein wurde das Diaminobenzidin (DAB)-Färbekit von Vector Laboratories (4 Minuten Einwirkzeit) verwendet. Schlussendlich wurden die Podozyten nach weiterem Waschen mit PBS mit Kaisers Glyceringelatine eingebettet. Analysiert und dokumentiert wurden die Schnitte mit dem Axioplan Mikroskop und der AxioVision Rel.4 Software von Zeiss.

##### *4.2.13.2. Immunfluoreszenz*

Die Podozyten wurden, wie für die Immunhistochemie unter 4.2.13.1 beschrieben, in *4-chamber-Slide* inkubiert und behandelt. Für die Färbung wurden die Zellen für 30 Minuten in 3,7% Formaldehyd/ PBS bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für fünf Minuten wurden die Proben in 10% BSA/PBS für eine Stunde bei RT blockiert. Die Präparate wurden über Nacht mit dem GAS2-AK (1:100) bei 4°C inkubiert.

Nach dreimaligen Waschen mit PBS/0,05% Tween 20 wurden die Zellen erneut mit 10%-igem BSA/ PBS für 30 Minuten bei RT inkubiert und danach mit dem sekundären Fluoreszenz-markierten Anti-Goat-AK (Alexa 568) in einer 1:500-Verdünnung für 3 Stunden eingesetzt wurde. Danach wurde die Proben dreimal mit PBS/0,05% Tween20 für 10 Minuten gewaschen. Die Zellkerne wurden über eine Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (5 Minuten, 1:1000) sichtbar gemacht. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS/0,05% Tween 20 wurden die Präparate mit Kaiser-Glyceringelatine eingedeckt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte unter Nutzung der entsprechenden Fluoreszenzmodule mit dem Axioplan Mikroskop und der AxioVision Rel.4 Software von Zeiss.

#### 4.2.13.3. Immunhistochemische Färbung der Paraffinschnitte

Für die immunologischen Untersuchungen wurden 5 µm Schnitte der in Paraffin-eingebetteten Mausnierenhälften von jeweils fünf *db/db* bzw. *db/m* Mäusen angefertigt. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37°C gelagert und im Anschluss in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert (2x 5 Minuten 100% Xylol, 100%-iger Ethanol zweimal 5 Minuten, 95%-iger Ethanol zweimal 3 Minuten, 70%-iger Ethanol 3 Minuten, 50%-iger Ethanol 3 Minuten, destilliertes Wasser zweimal 3 Minuten). Über das Erhitzen der Präparate in Citratpuffer (pH 6,0) erfolgte die Antigenfreilegung („*antigene retrieval*“) (viermal fünf Minuten bei 600 Watt in der Mikrowelle).

Zur Deaktivierung der endogenen Peroxidase wurde die Schnitte mit einer 3%-igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung 10 Minuten behandelt und anschließend dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Proben mit 5% Rabbit-Serum (Vectastain in PBS) für eine Stunde bei RT blockiert. Der primäre AK für Anti-GAS2 wurde 1:150 in der oben genannten Blockierlösung angesetzt und die Präparate damit bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert.

Die Inkubation der Präparate mit dem sekundären, biotinylierten AK (1:500) erfolgte nach den Angaben des Herstellers des Vectastain-Kits. Die Behandlung mit dem DAB-Substrat für 4 Minuten bei RT wurde ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt (DAB Substrate Kit, Vector Laboratories).

Die Objektträger wurden mit Kaisers-Gelatine eingedeckt und mit dem Zeiss Axioplan Mikroskop und der AxioVision Rel.4 Software analysiert. Zur Dokumentation und weiteren Auswertung wurden Aufnahmen von je 10 Glomeruli (insgesamt 306 Glomeruli aus 12 Mäusen) angefertigt. Dazu wurden Glomeruli verwendet, die etwa

gleichen Abstand zum Rand des Schnittes aufweisen (ca. 2 Blickfelder in der 1:400 Vergrößerung). Die Bilder wurden mittels ImageJ in Graustufen konvertiert und ausgewertet. Dabei wurde die Fläche der Glomeruli bestimmt und die durchschnittlichen Graustufenwerte für diese Flächen gemessen.

#### *4.2.13.4. Färbung der db/db-Mausnieren mit Immunfluoreszenz*

Für die Bestimmung der GAS2-Proteinexpression in den Podozyten *in vivo* wurde eine Immunfluoreszenzfärbung (IF)- Doppelfärbung angefertigt. Die Podozyten in den Nieren wurden dabei über eine Synaptopodin-Färbung markiert, da dieses ein spezifisches Protein terminal differenzierter Podozyten ist. Das Entparaffinieren, Dehydrieren und die Antigenfreilegung der 5 µm Nierenschnitte erfolgte wie in 4.2.13.3 beschrieben.

Nach dem Abkühlen der Präparate wurden diese für 3 Stunden mit 5% BSA in PBS bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem Anti-GAS2 AK (1:500 in PBS) und dem Anti-Synaptopodin AK (aus Kaninchen, 1:750, in PBS) versehen.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,1% Triton X-100 und erneutem 30-minütigem Blockieren mit 5% BSA in PBS wurde zuerst der AlexaFluor 568- markierte Anti-Goat-AK (1:1000) für zwei Stunden bei RT und Dunkelheit aufgetragen. Diese Schritte wurden für den zweiten sekundären Antikörper (Anti-Rabbit-IgG konjugiert mit AlexaFluor 488) wiederholt. Nach abschließenden Waschschritten und der Markierung der Zellkerne mit DAPI (1:1000 in PBS für 10 Minuten bei RT) wurden die Objektträger mit Kaisers-Glyceringelatine eingedeckt, mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop LASM700 von Zeiss aufgenommen und dem Programm LSM-Examiner von Zeiss ausgewertet.

#### **4.2.14. Transfektion und Überexpression**

Die podozytäre cDNS wurde für die Amplifikation des *GAS1 $\alpha$*  verwendet um diese anschließend in einen pCMV-myc Vektor zu klonieren. Dazu wurde das PCR-Produkt der vollständigen *GAS2/1 $\alpha$* -mRNS in einem 1,2% Agarosegel aufgetrennt und mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit aufgereinigt.

Mit jeweils 1 µl der Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI wurden 1 µl des pCMV-myc Vektors und 10 µl des aufgereinigten *GAS2/1 $\alpha$* -PCR-Produktes in einem parallelen Ansatz für 3 Stunden bei 37°C verdaut. Die Ansätze wurden erneut in einem 1,2% Agarosegel aufgetrennt und die Produkte aufgereinigt. Die darauf folgende Ligation



## Material und Methoden

wurde mit 6 µl des Fragmentes und 2 µl des gereinigten Vektors, 1 µl 10-fach Ligationspuffer (New England Biolabs) und 1 µl T4 DNS-Ligase für 30 Minuten bei RT durchgeführt.

Für die Transformation wurden 5 µl des Ligations-Mixes verwendet, der restliche Teil wurde bei 4°C gelagert. Dazu wurden 50 µl kompetente *E. coli*-Zellen (Invitrogen) 45 Minuten auf Eis inkubiert, für 45 Sekunden ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt und anschließend wieder auf Eis inkubiert. Dieser Suspension wurden 500 µl LB-Medium ohne Antibiotika zugesetzt und bei 37°C eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Ansatzes auf mit X-Gal-behandelten LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden drei positive Klone in je 50 ml flüssiges LB-Medium gegeben und für 24 Stunden bei 37°C im Schüttler angezogen. Aus diesen Flüssigkulturen wurde eine Plasmidpräparation mit dem QIAGEN Plasmid Mini Kit nach dem Herstellerprotokoll vorgenommen und die Plasmidkonzentration bestimmt.

Für die Transfektion wurde das Lipofectamin 2000-System und Lipofectamin plus verwendet. Die optimalen Transfektionsbedingungen wurden zunächst über die Transfektion von GFP ermittelt. Dazu wurden die über Nacht ausgehungerten Podozyten mit unterschiedlichen Ansätzen transfiziert. Dafür wurden jeweils 0 µg (Negativkontrolle), 2 µg oder 4 µg Plasmid sowie 0 µl (Negativkontrolle), 5 µl oder 10 µl Lipofectamin pro 3 ml RPMI verwendet. Die Transfektionseffizienz wurde mit Fluoreszenz bei einer Anregung von 395 nm und einer Emission bei für 509 nm nach 24 und 48 Stunden untersucht.

Der Transfektionsmix mit dem Myc-gekoppelten GAS2L1 $\alpha$ -Plasmid wurde daraufhin in einer Konzentration von 2 µg und 5 µl Lipofectamin 2000 auf 3 ml RPMI 1640 zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C mit dem Transfektionsmix inkubiert und danach die Zellen mit serumfreien RPMI 1640 für 24 Stunden inkubiert. Ein Teil der transfizierten Zellen wurden hierbei mit 5 mg/ml AGE-BSA bzw. Co-BSA behandelt.

Für die mRNA-Gewinnung wurden 6-Well Platten, für die Proteingewinnung 8 cm-Zellkulturschalen verwendet. Diese Proben wurden dann in der PCR auf GAS2L1 RNS bzw. im Western Blot und IHC mit c-myc-AK analysiert.

### **4.2.15. Apoptose Assay**

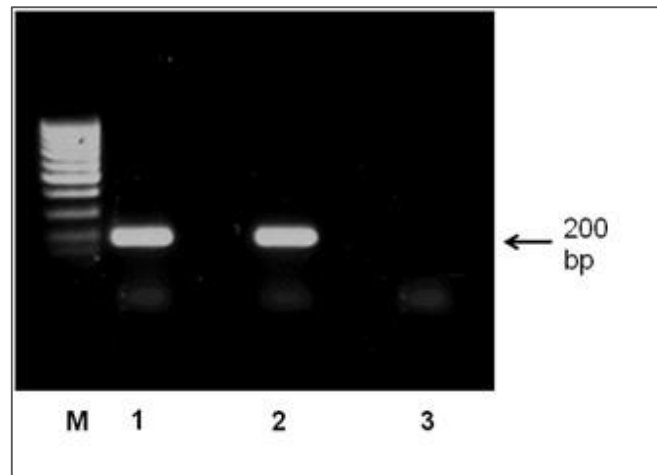
Zur Bestimmung des Einflusses von AGE-BSA, Co-BSA und der Transfektion der Zellen mit Lipofectamin 2000 wurde der Caspase Glo Assay zur Bestimmung der Caspase 3- und 7-Aktivität durchgeführt. Das Prinzip dieses Assays besteht darin, dass er eine an ein Tetrapeptid-gekoppelte Luziferase enthält. Diese Bindung kann durch aktive Caspasen 3 und 7 in den Zellen spezifisch gespalten werden und setzt die Luziferase frei, deren Aktivität anhand der Lichtfreisetzung detektiert werden kann.

Dazu wurde möglichst gleichmäßig jeweils 10'000 Podozyten in weiße, nicht durchscheinende 96-Well-Platten eingesät und für 24 Stunden mit 10% FKS in RPMI 1640 Medium inkubiert. Die anschließend ausgehungerten Zellen wurden in je 3 Gruppen à 3 Wells mit 0,1 µg GAS2L1-Plasmid und 0,25 µl Lipofektamin 2000 (in 50 µl) transfiziert. Weitere 3 Wells wurde als Kontrolle mit einem leeren 0,2 µg pCMV-myc-Plasmid und 0,5 µl Lipofektamin 2000 transfiziert. Als weitere Kontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen (0,1% FKS). Nach 24 Stunden wurden dann die das GAS2L1-Plasmid tragenden Zellen mit 5mg/ml AGE-BSA, 5 mg/ml Co-BSA, oder 10% FKS in RPMI 1640 für 24 Stunden behandelt. Die Zellen mit leeren pCMV-Vektor wurden mit 10% FKS in RPMI 1640 und die nicht transfizierten Zellen ebenfalls mit AGE-BSA, Co-BSA oder 10% FKS inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Podozyten, bei denen Apoptose über die Gabe von 5 µM Camptothecin induziert wurde. Zum Messen der Caspase-Aktivität wurde nach Ablauf der Inkubationszeit jeweils 100 µl Caspase Glo Assay Lösung pro Well pipettiert und nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten die Lumineszenzrate mit dem Luminometer Tecan „infinite M200“ ermittelt. Die Messwerte der jeweils drei gleichbehandelten Proben wurden gemittelt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Expression der *GAS2L1* $\alpha$ mRNA in Podozyten

Ein Nachweis der *GAS2L1*  $\alpha$  Expression in terminal differenzierten Podozyten wurde zuerst über eine semiquantitative PCR aus mit AGE-BSA und Co-BSA behandelten Podozyten erbracht (**Abbildung 12**).



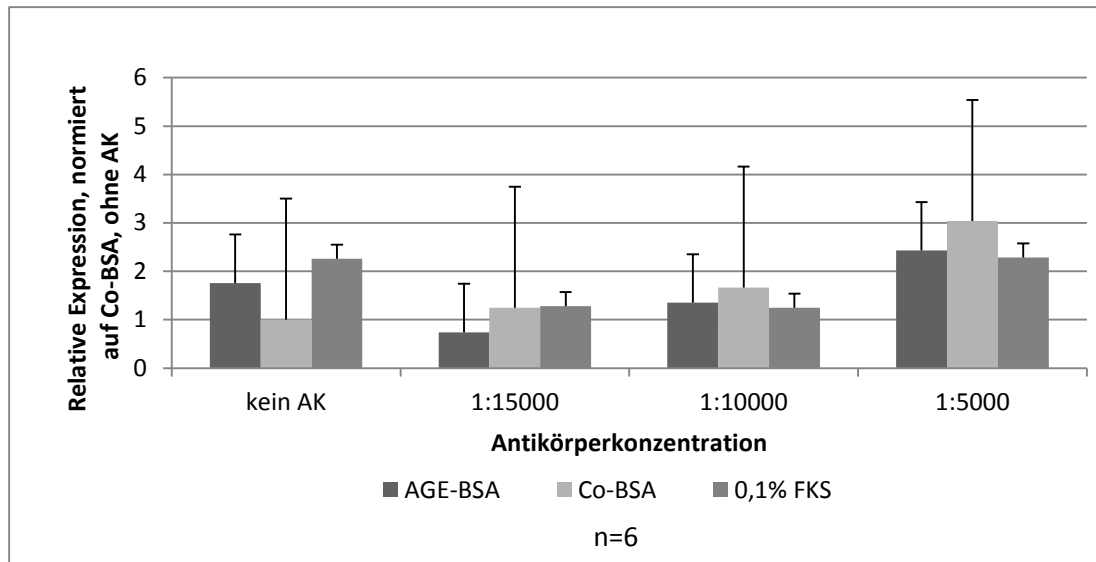
**Abbildung 12: Semiquantitative PCR von *GAS2L1*  $\alpha$  mRNA in Podozyten.** AGE-BSA (1), Co-BSA (2), Leerwert (3), 100 bp-Leiter (M).

Die Quantifizierung eines möglichen Unterschiedes erfolgte mit Real Time PCR. Dabei zeigte sich eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der *GAS2L1*-mRNA Expression um den Faktor  $1,75 \pm 3,9$  in AGE-BSA behandelten Podozyten (**Abbildung 14**).

Um eine Abhängigkeit des durch AGE-BSA erzeugten Prozesses von RAGE darstellen zu können, wurde dieser Rezeptor blockiert. Dazu wurde ein anti-RAGE-AK verwendet.

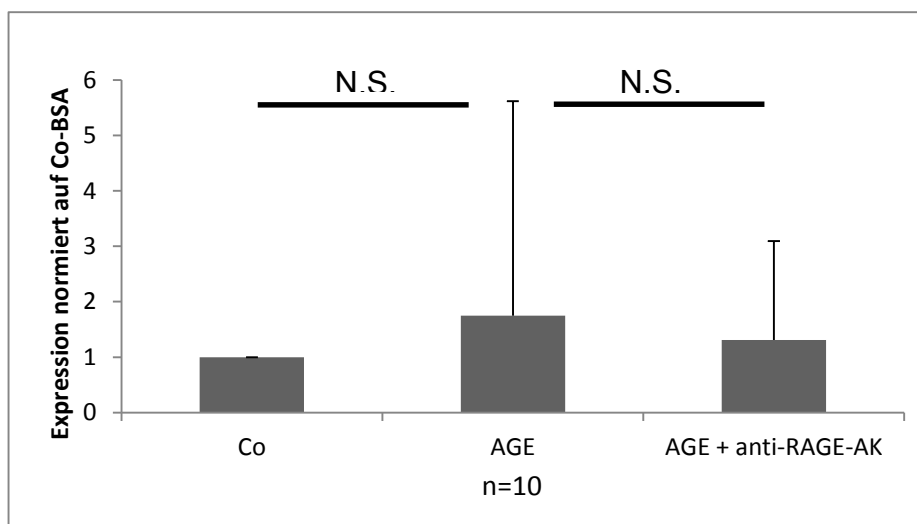
Die optimale Konzentration für diesen anti-RAGE-Antikörper wurde in einem Vorversuch ermittelt (**Abbildung 13**). Dabei zeigte sich für *GAS2L1* eine gute Reversibilität der Effekte bei Verdünnungen von 1:15'000 und 1:10'000 und ein Angleich der *GAS2L1*-mRNA-Expression bei AGE-BSA und Co-BSA. Bei höheren Verdünnungen des anti-RAGE-AK war eine erneute Erhöhung der Expressionslevel in allen Proben erkennbar. Die weiteren Versuche wurden deshalb mit einer Verdünnung von 1:10'000 fortgeführt.

## Ergebnisse



**Abbildung 13: Optimierung der anti-RAGE AK Konzentration in Bezug auf *GAS2L1α*.** Die Ergebnisse sind auf die *GAS2L1 α* Expression in Co-BSA behandelten Podozyten ohne AK normiert (n=6).

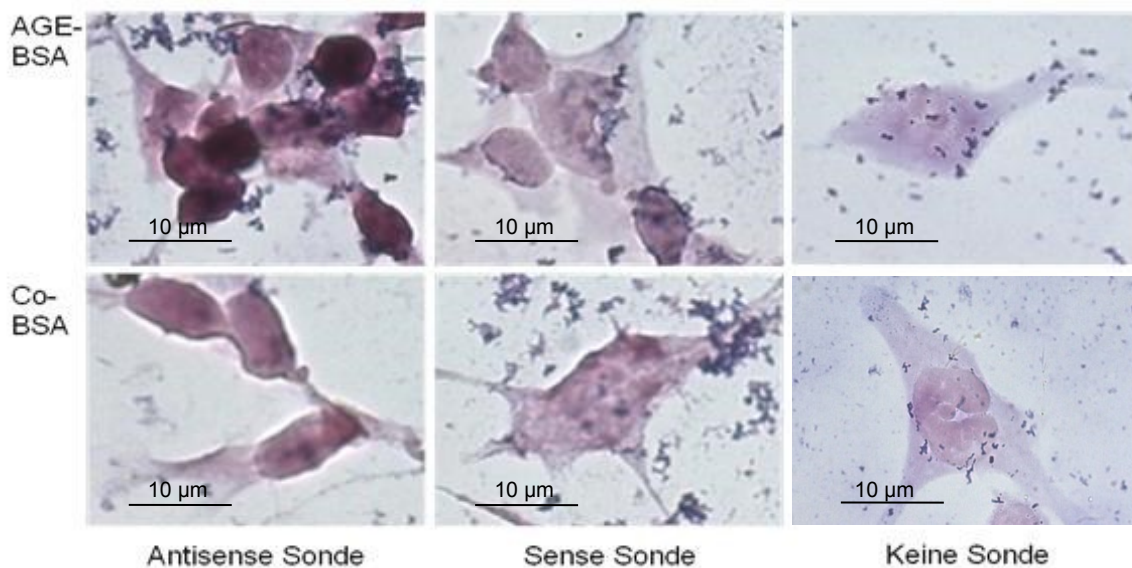
Die Expression von *GAS2L1 α* wurde daraufhin aus zwei unabhängigen Wiederholungen mit weiteren Proben bestimmt (**Abbildung 14**). Dabei konnte, neben der bereits beschriebenen, nicht signifikanten relativen Erhöhung der *GAS2L1*- Expression unter AGE-BSA ( $1,75 \pm 3,9$ ), ein Rückgang der Expression unter Blockierung des RAGEs beobachtet werden ( $1,31 \pm 1,8$ ). Wobei zwischen AGE-BSA und AGE-BSA+anti-RAGE-AK keine signifikanten Änderungen detektiert werden konnten.



**Abbildung 14: *GAS2L1α* Real Time-PCR aus Co-BSA bzw. AGE-BSA behandelter Podozyten.** Die Versuchsgruppen wurden auf die Expression von Co-BSA normiert. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Behandlungen (AGE-BSA, Co-BSA und AGE-BSA mit anti-RAGE-AK), aber eine tendenzielle Erhöhung der *GAS2L1α*-Expression unter AGE-BSA, die durch die Gabe von anti-RAGE-AK wieder aufgehoben wurde (n=10).

### 5.2. *In Situ* Hybridisierung von *GAS2L1 $\alpha$*

Zur Darstellung der zellulären Verteilung der *GAS2L1 $\alpha$*  - Expression wurde eine *in situ* Hybridisierung (ISH) durchgeführt. Diese zeigte nur sehr schwache Färbungen, so dass die Farbreaktion auf Zeiten bis zu 48 Stunden erweitert wurde. Die Analysen zeigten, dass die Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA im Vergleich zu Co-BSA eine leicht erhöhte Expression von *GAS2L1 $\alpha$*  vor allem im Bereich des Zellkerns, bedeutete. **Abbildung 15** zeigt repräsentative Bilder der ISH-Färbungen.

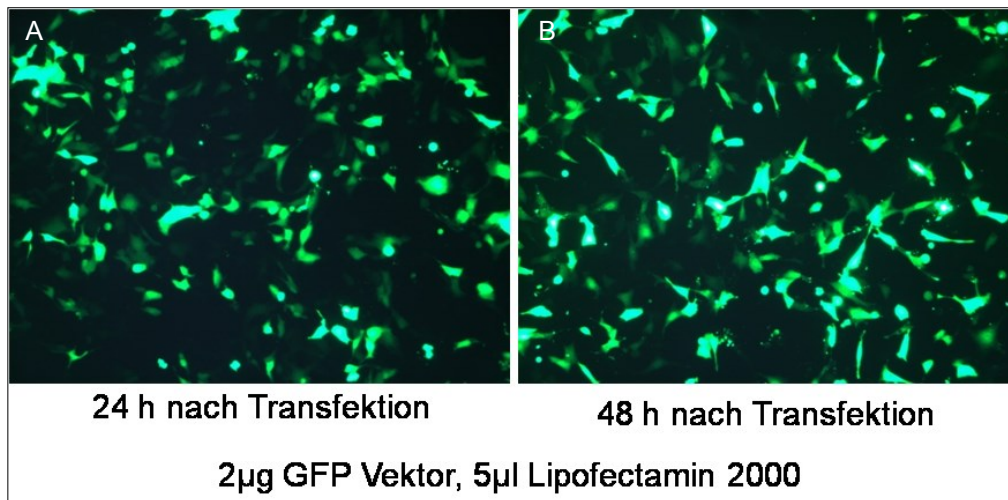


**Abbildung 15: *In Situ* Hybridisierung von *GAS2L1 $\alpha$* .** Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte von mit AGE-BSA bzw. Co-BSA behandelten Podozyten und den jeweiligen Sonden, sowie einer Färbung ohne Sonde

### 5.3. Überexpression von *GAS2L1 $\alpha$*

Mit der Überexpression von *GAS2L1 $\alpha$*  sollte die Wirkung des *GAS2L1 $\alpha$*  Proteins auf das Zytoskelett und die Apoptose von terminal differenzierten Podozyten untersucht werden. Dazu wurden die Podozyten mit einem pCMV-myc-*GAS2L1 $\alpha$* -Plasmid transfiziert. Zur Optimierung des Verfahrens wurde ein GFP-exprimierendes Plasmid zur Kontrolle eingesetzt. **Abbildung 16** zeigt die Transfektion der Podozyten mit 2 µg Plasmid und 5 µl Lipofectamin 2000 auf 3 ml RPMI 1640 als optimale Transfektionsbedingungen.

## Ergebnisse

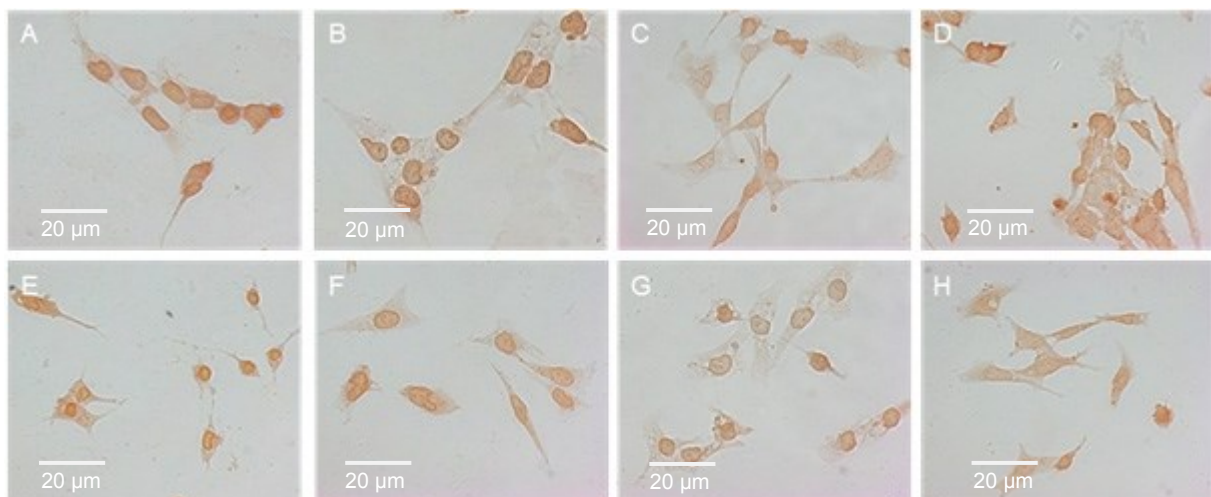


**Abbildung 16: Transfektion der Podozyten mit 2 µl GFP-Plasmid und 5 µl Lipofectamin 2000.** Es ist die Transfektion in steigender Effizienz nach 24 Stunden (A) und 48 Stunden (B) zu erkennen.

Diese Bedingungen wurden im Anschluss für die Transfektion der Zellen mit dem pCMV-myc-GAS2L1 $\alpha$ -Plasmid verwendet.

### 5.4. Myc-markierte -GAS2L1 $\alpha$ Immunhistochemie in Podozyten

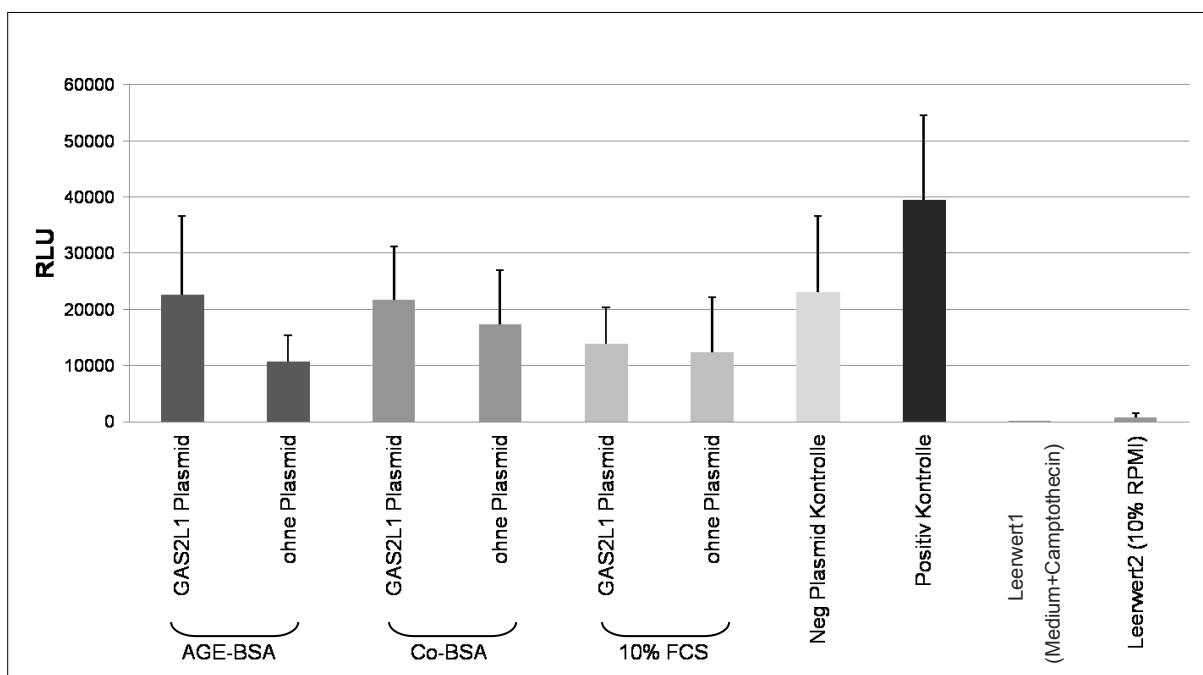
Die immunhistochemische Färbung von mit cMyc-GAS2L1 $\alpha$ -transfizierten Podozyten brachte, wie bereits im Western Blot, keine verwertbaren Ergebnisse. Eine tendenziell leicht erhöhte Expression von Myc-gekoppelten Protein in den Zellkernen unter Transfektion sowohl mit AGE-BSA und mit Co-BSA (**Abbildung 17 A und B**) war nicht reproduzierbar.



**Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis von c-Myc-markiertem GAS2L1 $\alpha$  in transfizierten Podozyten.** C-Myc-markiertes-GAS2L1 $\alpha$  Überexpression (A-C), pCMV-myc-Vektor Überexpression (D), kein Plasmid (E-G), Leervektor (H) und unterschiedlichen Seren (AGE-BSA (A,E), Co-BSA (B,F), 10%FKS (C,D,G,H)), Belichtungszeit 150ms, Färbereaktion 4 Minuten. Es sind keine Unterschiede zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Podozyten in der Markierung zu sehen.

### 5.5. Einfluss von GAS2L1 $\alpha$ auf die Apoptose in Podozyten

Um die Bedeutung des GAS2L1 $\alpha$  in den Podozyten zu untersuchen, wurde GAS2L1 $\alpha$  in den Zellen mittels nicht-viraler Transfektion überexprimiert. Die Bestimmung der Apoptoserate ergab eine große Streuung der Messwerte. Die Effekte variierten vor allem in Abhängigkeit davon, ob die Zellen transfiziert waren oder nicht. Die Behandlung der Podozyten mit Co-BSA oder AGE-BSA zeigte, auch ohne Transfektion keine signifikanten Unterschiede zur Behandlung mit 10% FKS. Positivkontrollen, Negativkontrollen und Leerwerte bestätigen die Spezifität des Assays (**Abbildung 18**).



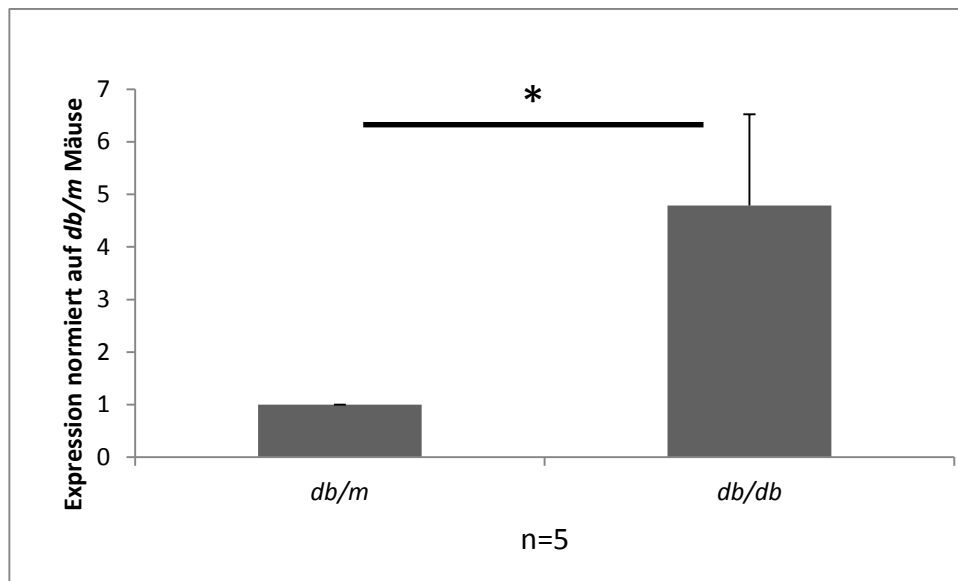
**Abbildung 18: Apoptoserate gemessen mit Caspase Glo Assay.** Für die Analysen wurden die Podozyten mit einem c-Myc-markiertem-GAS2L1 $\alpha$  Plasmid, einem leeren Plasmid (Negativ Kontrolle) oder mit Camptothecin behandelt (Positivkontrolle) und zusätzlich mit AGE-BSA, Co-BSA oder 10% FKS inkubiert und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 ermittelt. Die Ergebnisse sind in *relative light units* (RLU) dargestellt (n=3).

### 5.6. GAS2L1 Expression *in vivo*

Um die Effekte diabetischer Stoffwechselbedingungen auf die GAS2L1-mRNS Expression *in vivo* zu untersuchen, wurden Gesamtnierenlysate von diabetischen (*db/db*) und nichtdiabetischen (*db/m*) Mäusen untersucht. Die Real Time PCR Analysen zeigten in den *db/db*-Mäusen eine signifikante Erhöhung der GAS2L1-mRNS Expression um den Faktor  $4,8 \pm 1,7$  im Vergleich zu den Kontrolltieren (**Abbildung 19**). Die durchschnittlichen Blutglukosespiegel zum

## Ergebnisse

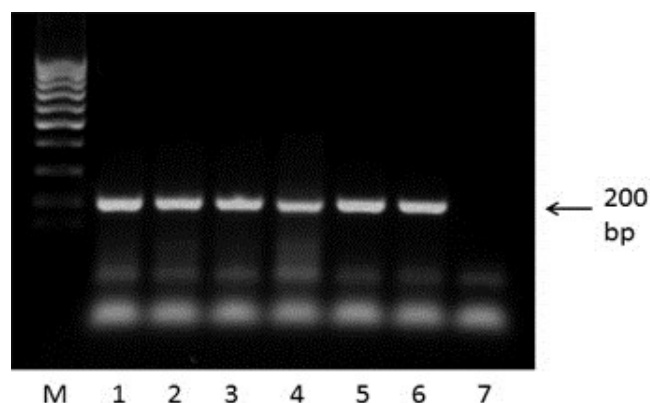
Untersuchungszeitpunkt waren in den diabetischen Mäusen tendenziell, jedoch nicht signifikant erhöht (12,27 mmol/l in db/db Mäusen bzw. 10,86 in db/m Mäusen, n=5, p=0,53 im Students-t-Test).



**Abbildung 19: GAS2L1 Expression in diabetischen Mäusen.** Die Versuchsgruppen wurden auf die Expression von db/m-Mäuse normiert. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen GAS2L1-mRNS-Expression unter diabetischen und nichtdiabetischen Tieren (n=5, \* p<0,05).

### 5.7. Expression von GAS2-mRNA in Podozyten

Neben GAS2L1 sollte auch die Expression von GAS2 untersucht werden. Dazu wurde zuerst die Expression dieses Genes in terminal differenzierten Podozyten unter AGE-BSA und Co-BSA Einfluss in der semiquantitativen PCR untersucht (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Semiquantitative PCR von GAS2 mRNA in Podozyten.** Die Abbildung zeigt die PCR-Produkte von mit AGE-BSA-behandelten Podozyten (1,2), Co-BSA-behandelten (3,4) und 10% FKS (5,6), sowie einen Leerwert (7) und die 100bp-Leiter (M).

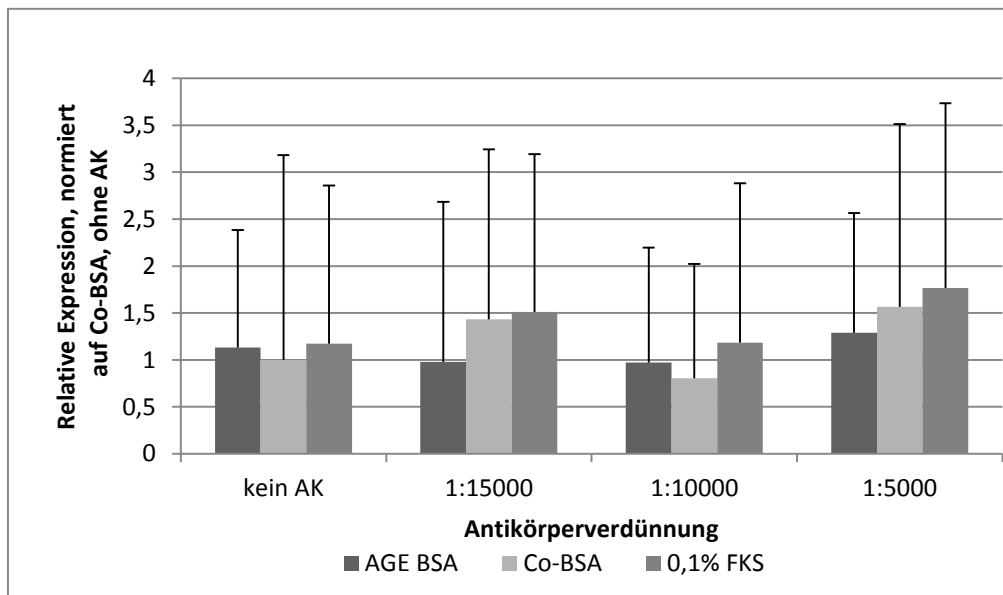


## Ergebnisse

Die Quantifizierung eines möglichen Unterschiedes in der Expression erfolgte durch Real Time PCR. Die Ergebnisse zeigten eine geringe, jedoch signifikante Erhöhung der GAS2-mRNS Expression um den Faktor  $2,26 \pm 1,42$  (**Abbildung 22**).

Um eine Abhängigkeit des durch AGE-BSA erzeugten Prozesses von RAGE darstellen zu können, sollte dieser, wie bereits bei GAS2L1, mit einem RAGE AK blockiert werden.

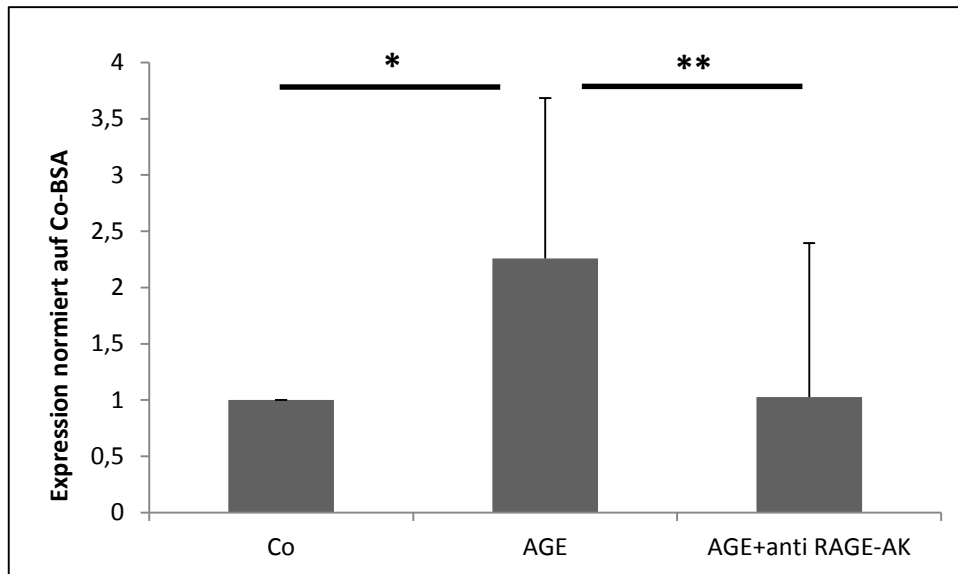
Im Vorversuch (n=6) wurde die optimale Verdünnung für den anti-RAGE-Antikörper gesucht. Dabei zeigte sich für GAS2 eine schwache Reversibilität der Effekte bei einer Antikörperverdünnung von 1:10'000. (**Abbildung 21**). Deshalb wurden die weiteren Versuche mit einer Konzentration von 1:10'000 fortgeführt. Hierbei konnten jedoch keine signifikanten Effekte beobachtet werden.



**Abbildung 21: Real Time PCR zur Testung der optimalen anti RAGE-AK Konzentration für GAS2.** Die Ergebnisse sind auf die GAS2 Expression in Co-BSA behandelten Podozyten ohne AK normiert (n=6).

Anschließend wurde bei den Analysen nur noch mit der 1:10'000 Verdünnung des anti-RAGE-AK gearbeitet. Die Zusammenfassung der Ergebnisse beider Versuche ist der **Abbildung 22** zu entnehmen. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der GAS2-Expression unter AGE-BSA und RAGE-Blockierung auf das Level der Co-BSA behandelten Podozyten im Vergleich zu der alleinigen Inkubation der Podozyten mit AGE-BSA, die eine signifikant erhöhte Expression von GAS2 bedeutete.

## Ergebnisse

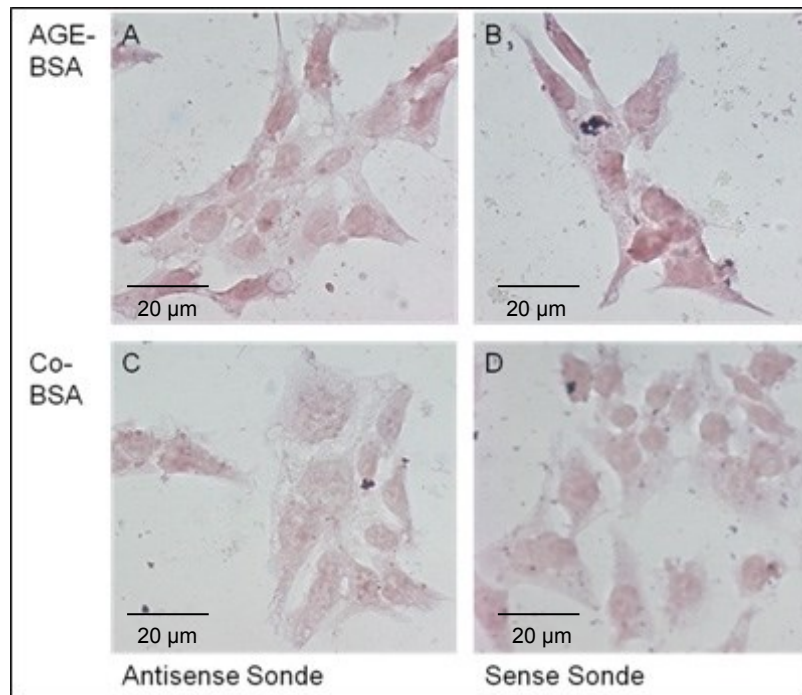


**Abbildung 22: GAS2 Real Time PCR aus Co-BSA bzw. AGE-BSA behandelten Podozyten.** Normiert auf Co-BSA. Zu sehen ist ein signifikanter Anstieg der Expression von GAS2 unter AGE-BSA Behandlung auf das 2,26fache, die durch die Inkubation mit dem anti-RAGE-AK wieder revidiert wird. (n=12, \* p<0,05, \*\* p<0,01).

### 5.8. *In situ* Hybridisierung von GAS2

Über die *in situ* Hybridisierung sollte die GAS2- Expression in den Podozyten untersucht werden. Die Daten zeigten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen oder zwischen den Antisense- und Sensesonden. Die **Abbildung 23** zeigt repräsentative Färbungen für die jeweiligen Behandlungen der Podozyten mit AGE-BSA, Co-BSA bzw. den Markierungen mit der jeweiligen Sense- oder Antisense Sonde (*Forward* und *Reverse*).

## Ergebnisse



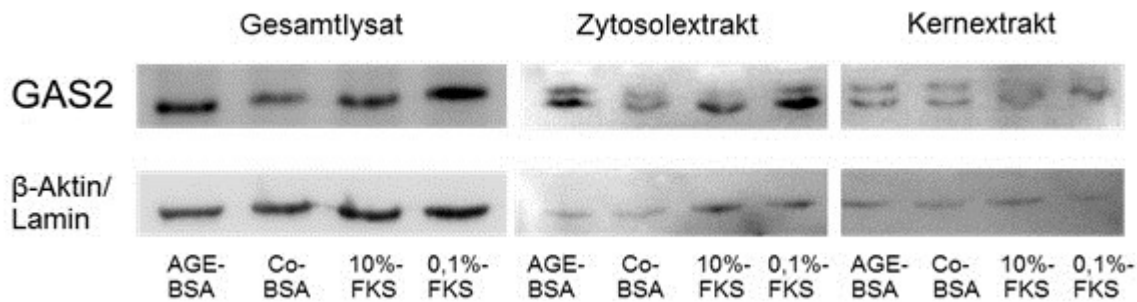
**Abbildung 23: ISH-Markierung von GAS2.** Gezeigt werden repräsentative Bilder der Markierung von GAS2 mRNA Expression über Antisense und Sense Sonde für AGE-BSA- und Co-BSA-behandelte Podozyten.

### 5.9. Western Blot Untersuchung des GAS2 Proteins

Der GAS2-Proteinegehalt in terminal differenzierten Podozyten sollte im Western Blot untersucht werden. Dafür wurde sowohl das Gesamtproteinlysate aus Podozyten gewonnen als auch zusätzliches Kern- und Zytosollysate.

Die Analyse von GAS2 im Gesamtproteinlysate zeigte eine signifikante Erhöhung von GAS2 bei Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit Co-BSA. Im Zytosolextrakt war diese Änderung ebenfalls nachweisbar, jedoch statistisch nicht signifikant. In den Kernextrakt konnte GAS2-Protein in geringen Mengen nachgewiesen werden, jedoch ohne Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen (**Abbildung 24**).

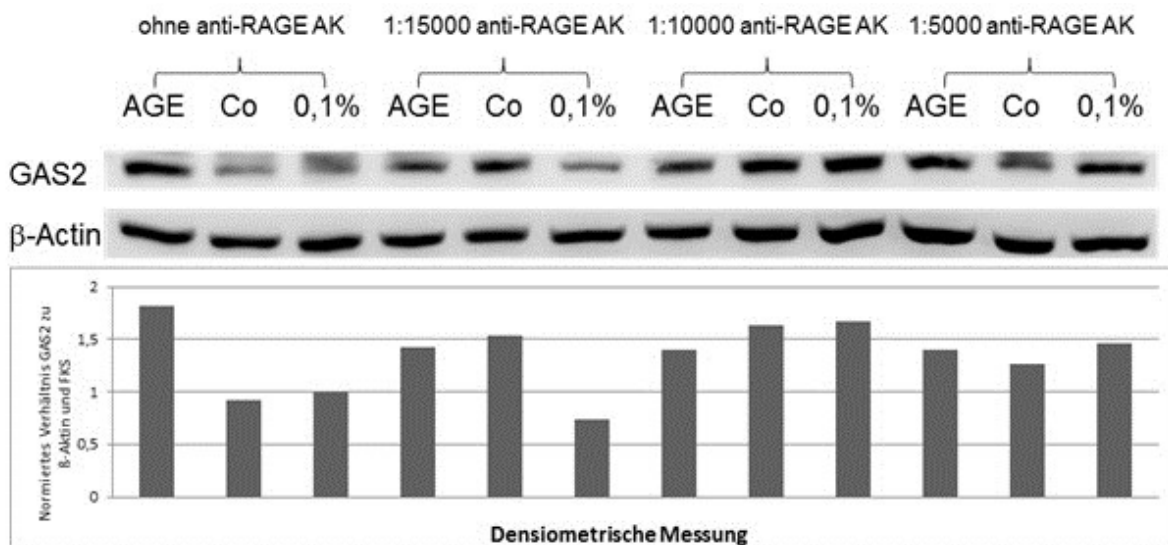
## Ergebnisse



**Abbildung 24: Western Blot vom GAS2 Protein.** Es wurde Protein aus dem Gesamtzelllysat, den zytoplasmischen und den Zellkern-Extrakten analysiert. Als Ladeprobe diente der Nachweis von  $\beta$ -Aktin, im Kernextrakt Lamin jeweils unter AGE-BSA, Co-BSA, 10% FKS und 0,1% FKS in RPMI 1640.

### 5.10. GAS2 Proteinexpression in Podozyten bei Blockade von RAGE

Auch auf Proteinebene sollte analysiert werden, ob die durch AGE-BSA hervorgerufenen Effekte hinsichtlich der GAS2-Proteinexpression RAGE-vermittelt sind. Dazu wurden einmalig verschiedene Verdünnungen des anti-RAGE-AK getestet (1:15'000, 1:10'000, 1:5'000; **Abbildung 25**)



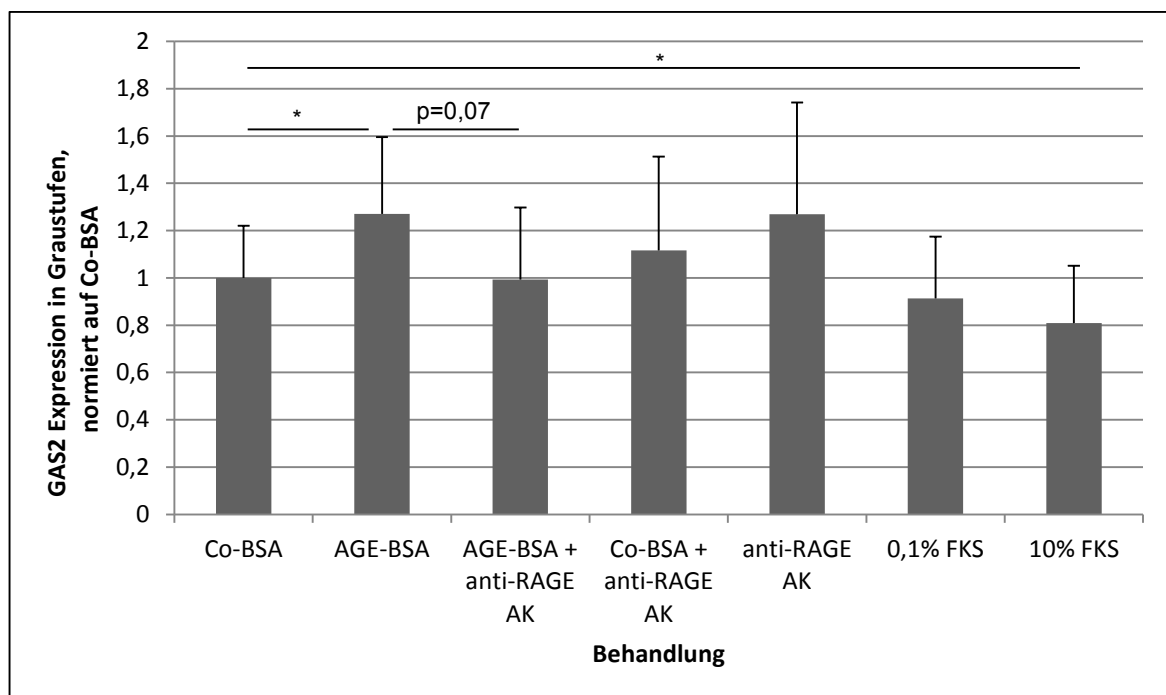
**Abbildung 25: Testung der GAS2-Proteinexpression bei Inkubation der Podozyten mit dem anti-RAGE-AK in verschiedenen Verdünnungen.** Dafür wurden die Podozyten mit AGE-BSA, Co-BSA bzw. 0,1%FKS in RPMI 1640 behandelt und die entsprechenden AK-Verdünnungen zugegeben. Die Proteinexpression wurde mit dem Western Blot ermittelt und densitometrisch bestimmt.

## Ergebnisse

Die Bestimmung der Proteinexpression mit dem Western Blot zeigte, dass AGE-BSA eine erhöhte Akkumulation von GAS2 im Vergleich zu Co-BSA induziert. Die Behandlung der Podozyten mit dem anti-RAGE-AK konnte diesen Effekt aufheben und die GAS2-Proteinexpression wieder auf das Niveau bei Behandlung mit Co-BSA senken. Wobei aber angemerkt werden muss, dass allein die Inkubation der Zellen mit dem AK eine Erhöhung des Proteinlevels bedeutete.

Die Effekte bei der 1:10'000-Verdünnung und der 1:5000-Verdünnung zeigten beide ähnliche Annäherung der Co sowie AGE-BSA-Werte, die weiteren Versuche wurde deshalb die 1:10'000 Verdünnung verwendet, da diese bei der Testung des anti-RAGE AKs für die mRNA optimal war.

Es wurden in mehreren Wiederholungen (bis zu n=16) im Western Blot untersucht, welchen Einfluss die Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA bzw. eine Blockade von RAGE auf die Proteinexpression von GAS2 ausübt. (**Abbildung 26**)



**Abbildung 26: GAS2 Proteinexpression in Podozyten, densitometrische Auswertung der Western Blots.** Die Proteinexpression von GAS2 wurde unter verschiedenen Bedingungen analysiert und auf die Expression von Aktin und Co-BSA normiert; n=14 für AGE, n=16 für Co-BSA, n=5 für anti-RAGE AK, n=7 für alle anderen Proben; \* p<0,05. Anti-RAGE AK

Die Auswertung der Western Blots ergab eine signifikante Erhöhung der GAS2-Proteingehalte auf ca. 127%. Die Blockade von RAGE über die Inkubation der Podozyten mit dem anti-RAGE-AK bedeutete einen Rückgang der GAS2-Proteinexpression auf das Niveau von Co-BSA. Diese Änderungen war jedoch nicht

signifikant ( $p=0,07$ ). Es muss aber beachtet werden, dass die alleinige Zugabe des anti-RAGE-AK eine gesteigerte Akkumulation des GAS2 - Proteins bedeutete.

Alle anderen Verhältnisse weisen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede aus.

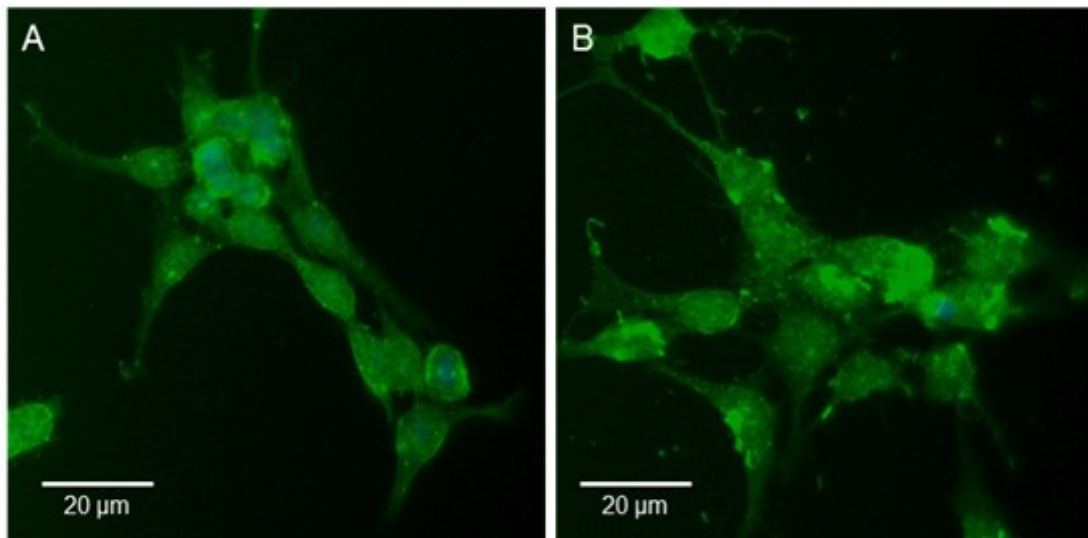
### 5.11. Immunhistochemie von GAS2

Es wurde die Verteilung von GAS2 ebenso immunhistochemisch analysiert. Die Auswertung ergab eine erhöhte GAS2-Proteinexpression in den mit AGE-BSA-behandelten Podozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe der mit der Co-BSA-behandelten Podozyten. Die Inkubation der Zellen mit AGE-BSA und dem anti-RAGE-AK (1:10'000 Verdünnung) zeigte ebenso eine verminderte GAS2-Proteinexpression in den Podozyten (**Abbildung 27**).



**Abbildung 27: Immunhistochemische Analyse von GAS2-Proteinexpression in den Podozyten** unter AGE-BSA (A), Co-BSA (B) AGE-BSA und anti-RAGE AK (C) (Aufnahmezeit 150 ms,)

Zusätzlich zu der Immunhistochemie wurde GAS2 mit der Immunfluoreszenz in den Podozyten detektiert. Die Analysen wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen Co-BSA und AGE-BSA auf, sowohl hinsichtlich dem Expressionsniveau als auch der Verteilung des Proteins (**Abbildung 28**).



**Abbildung 28:** Immunfluoreszenz von Podozyten unter AGE-BSA (A) und Co-BSA (B), 3000ms Aufnahmezeit. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Behandlungen beobachtet werden.

Den Aufnahmen ist zu entnehmen, dass GAS2 eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation innehat. Besonders auffallend sind dabei einige verstärkte, granulierte Strukturen, die sich unregelmäßig im Plasma verteilen. Eine besondere Färbung der Zellkerne kann nicht beschrieben werden.

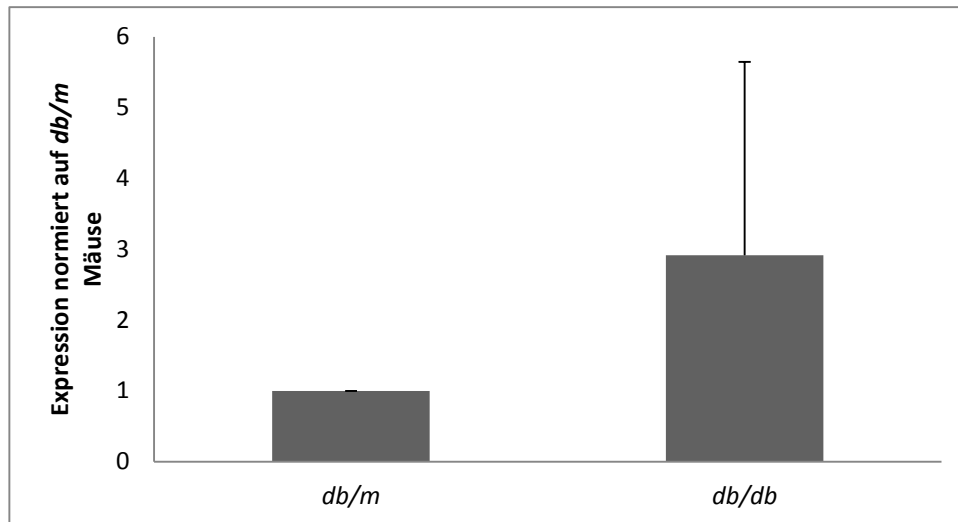
### 5.12. Analysen in *db/db*-Mäusen

#### 5.12.1. GAS2 mRNS-Expression in *db/db*-Mäusen

Um die *in vitro* Daten zu überprüfen, wurden die GAS2-mRNS und Proteingehalte *in vivo* in einem typischen Modell für den Typ 2 Diabetes mellitus überprüft – den *db/db*-Mäusen. Die Analyse der mRNS-Expression in Gesamt-Nierenlysaten mit der Real Time PCR zeigte einen nicht signifikanten Anstieg um einen Faktor von 2,92 (SD=2,73) bei *db/db* Mäusen gegenüber den Kontroll- *db/m* Tieren (**Abbildung 29**)



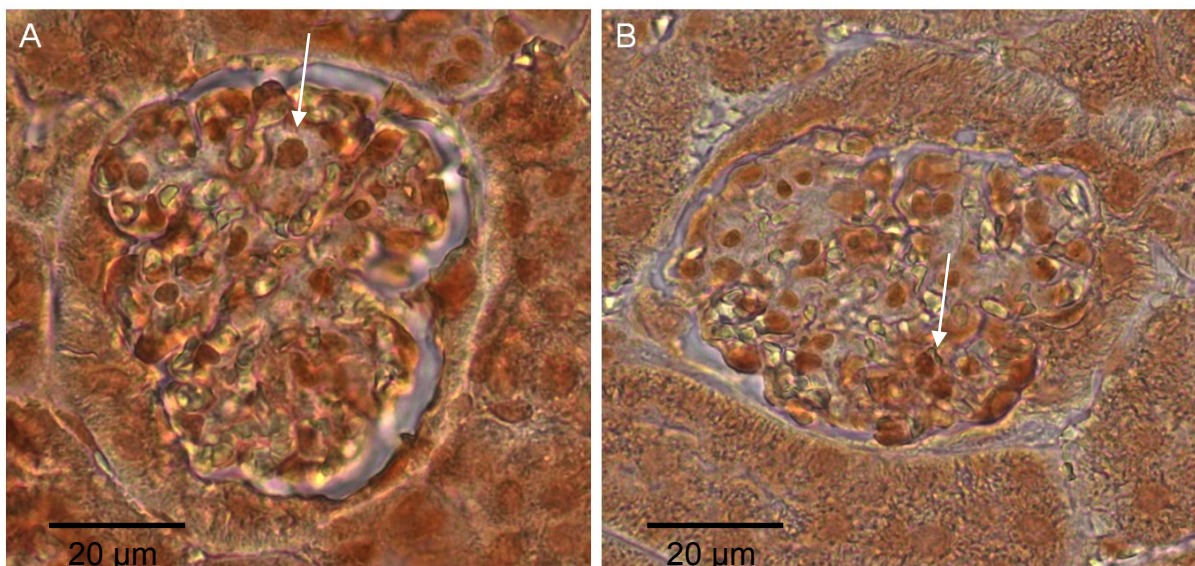
## Ergebnisse



**Abbildung 29: Expression von GAS2 in diabetischen (*db/db*) und nicht diabetischen (*db/m*) Mäusen.** Die GAS2 -Expression war in den *db/db*-Tieren tendenziell erhöht im Vergleich zu den Kontrolltieren (n=6).

### 5.12.2. Immunhistochemische Untersuchung von GAS2 *in vivo*

Die GAS2-Proteinexpression in den Glomeruli der Tiere wurde immunhistochemisch überprüft. Die Analysen zeigten eine leicht erhöhte Abundanz von GAS2 in allen Strukturen sowie eine leicht gesteigerte Akkumulation innerhalb des Glomeruli (Pfeil) (**Abbildung 30**). Eine weitere spezifische Verteilung des GAS2 Protein konnte nicht beobachtet werden.

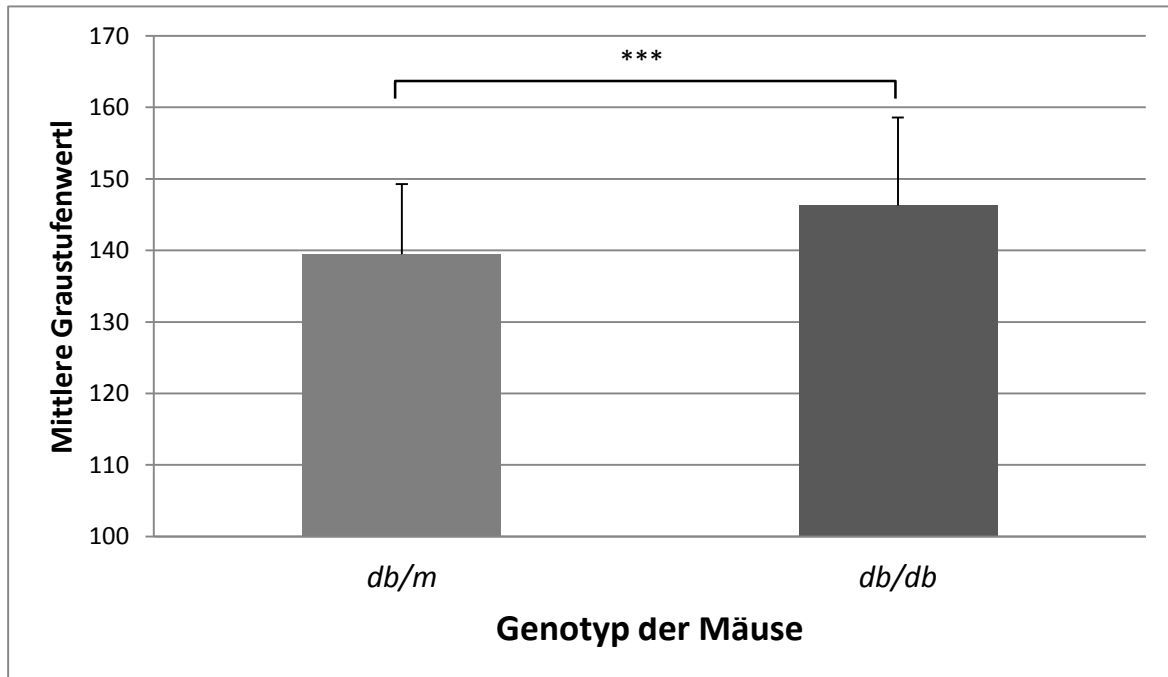


**Abbildung 30: Immunhistochemie von GAS2 in *db/db*- (A) und *db/m*- (B) Mäusen.** Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen eines Glomerulus (n=12).



## Ergebnisse

Die Auswertung der Glomeruli zeigte einen leichten, jedoch stark signifikanten Anstieg der GAS2-Proteinexpression in den Glomeruli der *db/db*-Mäuse gegenüber den *db/m* Mäusen um durchschnittlich 7 Graustufenwerte bzw. 4,8% bei einer Standardabweichung von 12,31 für *db/db*-Mäuse und 9,79 Mittlere Graustufenwerte für *db/m*-Mäuse (**Abbildung 31**).

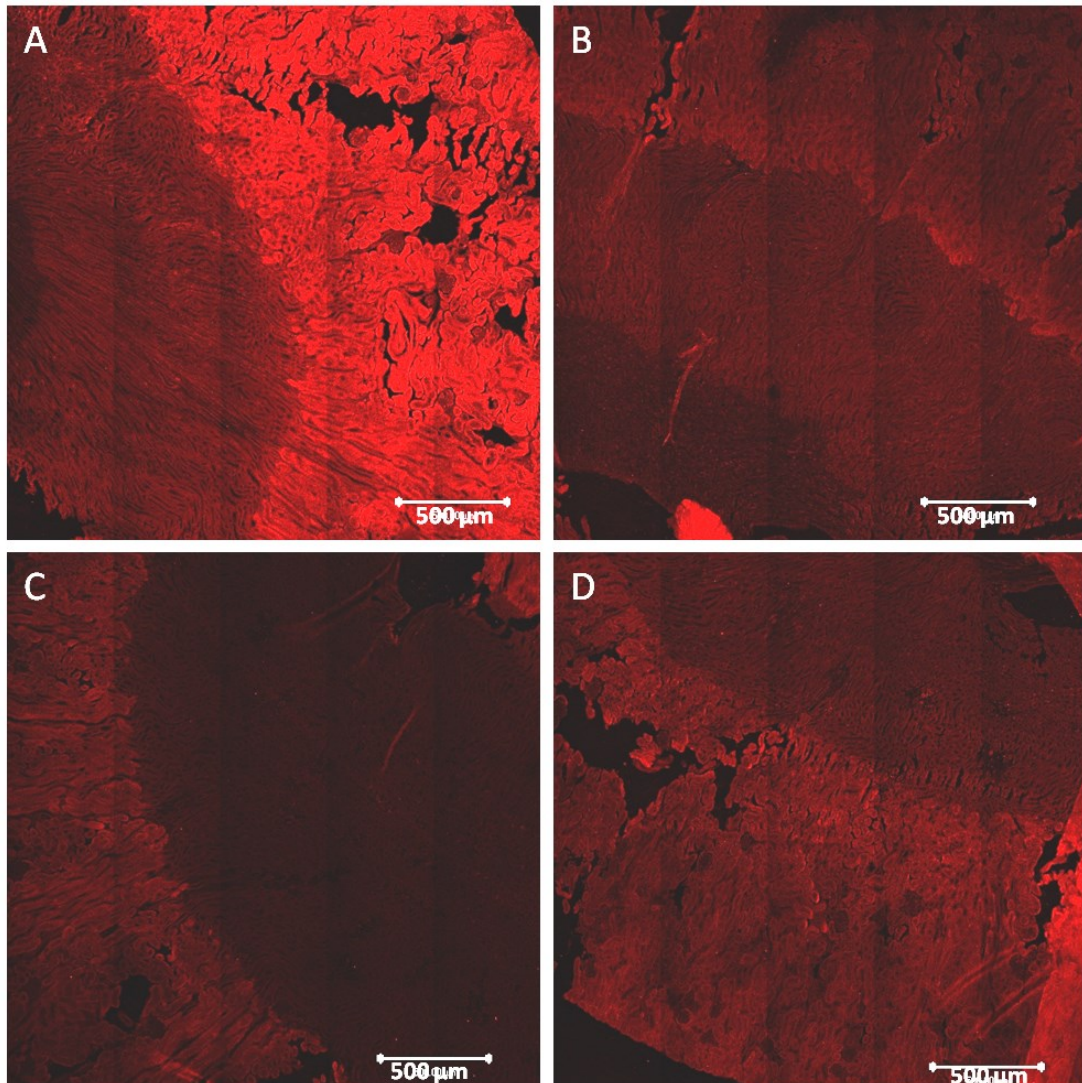


**Abbildung 31: Gemittelte Graustufenwerte der Glomeruli in der Färbung des GAS2-Proteins.** Gemessen mittels ImageJ im Echtfarbenaufnahme. Die Auswertung zeigte einen leichten, aber signifikanten Anstieg von GAS2 in den Glomeruli diabetischer Mäuse;  $n=12$ , \*\*\*  $p<0,001$ .

Des Weiteren wurden die stark gefärbten Punktbereiche für jedes Glomerulum ausgezählt und auf die jeweilige Fläche des Glomerulum im jeweiligen Anschnitt normiert. Dabei zeigte sich eine leichte, signifikante ( $p<0,001$ ) Zunahme dieser Ratio bei *db/db*-Mäusen zu *db/m* Mäusen um 1,11fache, mit einer Standardabweichung von 0,19 für *db/m* Mäuse und 0,26 bei *db/db* Mäusen.

Die Übersichtsaufnahmen der Nierenschnitte zeigten sowohl für die *db/db*- als auch für *db/m*-Mäuse einerseits Schwankungen für die Expression des GAS2-Proteins innerhalb der Mausgruppen, zum anderen waren zwei unterschiedlich stark markierte Bereiche erkennbar (ein hellerer an der Rinde und ein dunklerer im Mark), wobei eine deutliche Grenze zwischen beiden Bereichen der Tubuli sichtbar war (**Abbildung 32**).

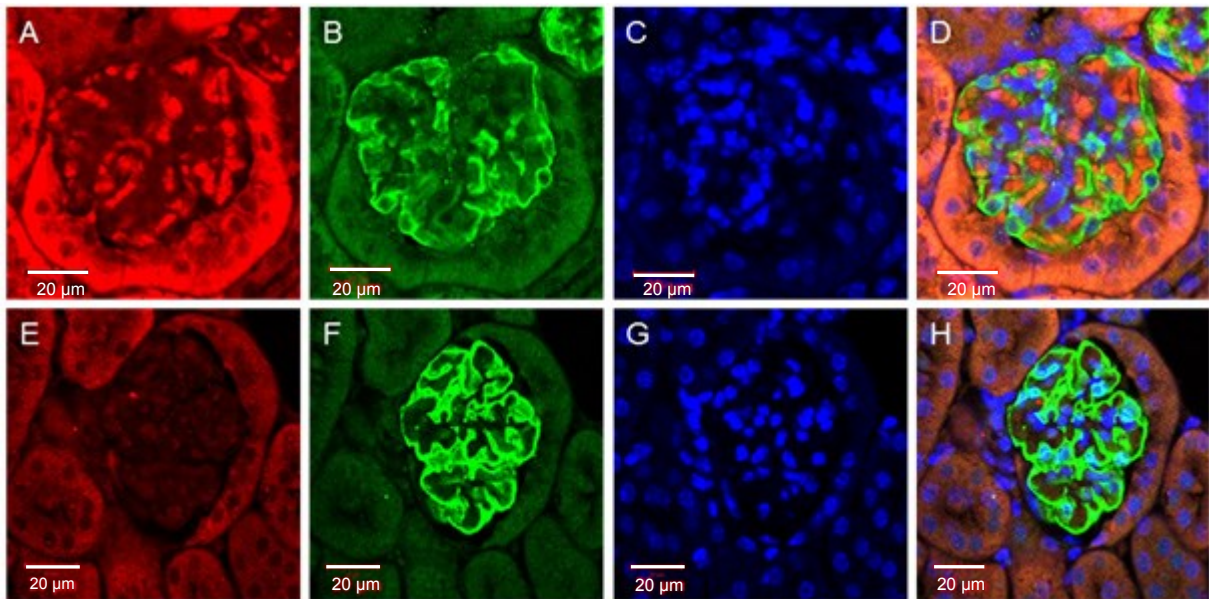
## Ergebnisse



**Abbildung 32: Übersichtsaufnahme der IF-Färbung von GAS2 in *db/db*-Mausnieren (A und B) und in *db/m*-Tieren (C und D) zusammengesetzt aus 5x5 Einzelaufnahmen mittels der Tile-Scan-Funktion des LSM700 von Zeiss. Die Abbildungen zeigen die unterschiedlichen Konzentrationen und Verteilungen des GAS2-Proteins im Nierenquerschnitt.**

Da der oben erwähnte Gradient zwischen Rinde und Mark zusätzlich zu den interindividuellen Unterschieden eine starke intraindividuelle Streuung verursacht, wurden nur Glomeruli ausgewertet, die im zweiten Blickfeld neben der Rinde lagen. Die Auswertung der glomerulären Bereiche zeigte eine schwächere Färbung der Glomeruli im Verhältnis zum umgebenden Gewebe (**Abbildung 33**), was im gewissen Widerspruch zu der IHC-Färbung steht. So belegen vor allem die proximalen Tubuluszellen eine stärkere Proteinakkumulation für GAS2, wobei eine signifikante Aussage aufgrund des geringen Stichprobenumfangs nicht möglich ist.

## Ergebnisse



**Abbildung 33:** IF der *db/db*-Maus (A-D) bzw. *db/m* Maus (E-H) Glomeruli: GAS2-Protein (A, E), Synaptopodin (B, F), DAPI (C, G), Synopsis (D, H). Aufgenommen mit dem Ism700, Zeiss.

Die Glomeruli zeigen eine starke Markierung der Makula densa. Die Doppelfärbung mit Synaptopodin ermöglicht eine Aussage über die spezifische Lokalisation von GAS2 in den Podozyten. Die Aufnahmen (**Abbildung 33**) zeigen eine deutlich höhere GAS2-Proteinexpression in den Podozyten der *db/db*-Tiere im Vergleich zu der Kontrolle *db/m*. Das Anfärben der Zellkerne mit DAPI belegt, dass GAS2 eine vorwiegend zytoplasmatische Färbung innehat.

Eine Färbung einzelner Zellen ist ebenfalls sichtbar, wie sie schon in der IHC beobachtet werden konnte. Diese Zellen sind durch die Doppelfärbung des Synaptopodeins besser zuzuordnen. Hier sieht man die Markierung des GAS-Proteins im Zytoplasma, an dessen Saum Synaptopodin zu sehen ist, also in den Podozyten. Bemerkenswert ist weiterhin, dass die Regionen der Zellkerne eher schwach gefärbt wurden.

## 6. Diskussion

Bei der DN ist die pathophysiologische Bedeutung der *Advanced Glycation Endproducts* (AGE) mittlerweile unbestritten. Jedoch ist der genaue Einfluss der AGEs auf die verschiedenen Gewebe und Zellen in all der Komplexität noch nicht vollständig geklärt. Gut untersucht sind bisher die Wirkweise der AGEs über die Bindung an den diversen Rezeptoren (RAGE, AGE-R1-R3, der *macrophage scavenger receptors* ScR-II und CD-36, Neeper et al. 1992) jedoch nicht die Komplexität der darauf folgenden Schritte und was sie in der Summe im Nierengewebe bewirken.

Der Übergang der terminal differenzierten Podozyten, die unter AGE-Einfluss aus der G<sub>0</sub> Phase zurück in die G<sub>1</sub> Phase, jedoch nicht in die S-Phase übergehen, wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe untersucht (Rüster et al 2008, Liebisch et al. 2013). Diese Untersuchungen zeigten, dass AGEs über eine erhöhte Expression von p27<sup>Kip1</sup> (Wolf 2004, Rüster et al. 2008) und verminderte Expression von *NIPP1* (Liebisch et al. 2014) einen Zellzyklusarrest in Verbindung mit einer Hypertrophie der Zellen in den Podozyten induzieren. Im Rahmen von Differential Display Analysen (Bondeva et al. 2009) zeigte sich, dass AGEs die Expression der *GAS2* und *GAS2L1 $\alpha$*  in den Podozyten beeinflusst. Die Bedeutung von *GAS2L1 $\alpha$*  und *GAS2* in den Podozyten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

*GAS2* und *GAS2L1* stellen eine Verbindung zwischen Zellskelett und Apoptoseregulation dar (Brancolini et al. 1992). Auch aus diesem Grund sind sie interessant in Bezug auf Vorgänge, die während der DN stattfinden.

Die Rolle von *GAS2L1* ist bisher noch nicht vollständig geklärt. In der Literatur wird beschrieben, dass dieses Protein *GAS2*-ähnliche Funktion hat und ein an das Mikrotubuli-System der Zelle bindet (Goriounov et al. 2002), weshalb spekuliert wird, ob *GAS2L1* als Verbindung zwischen den einzelnen Elementen des Zytoskeletts fungiert (Sun et al. 2001). Die Regulation und Funktion des *GAS2*-Gens und -Proteins ist hingegen ausführlich beschrieben. *GAS2* bindet Aktin-Filamente und reguliert auch indirekt das Protein p53 (Benetti et al. 2001). In menschlichen Leukämiezelllinien konnte das Interferon-bindende Protein IKSBP als Transkriptionsfaktor für *GAS2* nachgewiesen werden (Huang et al. 2010). Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine Überexpression von *GAS2* mit einer starken Veränderung der Zellmorphologie einherging (Brancolini et al. 1995). Des Weiteren

ist bekannt, dass GAS2 durch die Caspasen 3 und 7 gespalten und dadurch aktiviert wird, da die Überexpression von GAS2 eine höhere Anfälligkeit der Zellen für Apoptosetrigger verursacht (Lee et al. 1999).

Für andere Gene der GAS-Familie sind die Regulations- und Wirkmechanismen in der Pathophysiologie der DN besser aufgeklärt. So sind beim Vitamin K abhängigen GAS6 die Zusammenhänge zwischen Hypertonie und DN untersucht wurden. Es konnte nachgewiesen werden, dass Angiotensin II als Mediator über GAS6 in hypertonen Mäusen sowohl eine kardiale Hypertrophie als auch eine Glomerulofibrose auslösen kann (Park et al. 2009). Für die Regulation des GAS2 und GAS2L1 hingegen konnten wir ein Zusammenhang mit dem RAGE-Rezeptor zeigen, wobei ein Zusammenhang zum RAAS ebenfalls möglich erscheint. Während bei GAS6 eine Wirkung über den Tyrosin Kinase Rezeptor Axl bis hin zur Hypertrophie der Podozyten und Mesangiumzellen gezeigt wurde (Arai et al. 2008), scheint GAS2 intrazellulär über die Caspasen eine Regulation des Zellzyklus zu beeinflussen (Sgorbissa et al. 1999). Bei Patienten mit DN konnten erhöhte GAS6 Serumspiegel nachgewiesen werden (Lee JI et al, 2012). Untersuchungen zum humanen GAS2 und GAS2L1 *in vivo* in der DN stehen noch aus.

Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von AGEs auf die Expression von GAS2 und GAS2L1 in den Podozyten analysiert und deren Bedeutung für die Zellen näher untersucht werden.

### **6.1. GAS2L1**

#### **6.1.1. GAS2L1-mRNS Expression**

Bezüglich der Regulation von *GAS2L1* ist in der Forschung nur die Rolle in der Erythropoese genauer untersucht und veröffentlicht wurden. Dort scheint es direkt über den Thyroidrezeptor herauf reguliert zu werden (Gamper 2009). Weiterhin scheint eine Regulation über die PKC, TGF- $\beta$ -Achse möglich. Für Nierengewebe sind solche Untersuchungen bis dato noch nicht durchgeführt worden.

In unserer Arbeitsgruppe wurde in einem Differential Display eine erhöhte Expression der  $\alpha$ -Isoform des GAS2L1-RNS, jedoch nicht in der  $\beta$ -Isoform gezeigt. Dies bestätigte sich in der semi-quantitativen PCR.

Aufgrund der Literatur lässt sich zumindest für das GAS2L1 $\alpha$ -Protein eine funktionell eher untergeordnete Bedeutung vermuten, da dieses, zumindest bei Mäusen nicht in den Nieren exprimiert gefunden wurde (Goriounov 2003).

Für die GAS2L1-mRNS konnte die Hochregulierung auf das 1,69 fache unter glykiertem BSA zwar als Tendenz beobachtet werden, jedoch mit einem  $p=0,17$  als nicht signifikant in den *in vitro* Versuchen mit Podozyten nachgewiesen werden. Für die *in vitro* Versuche konnte die Reversibilität der Effekte durch die Blockierung des AGE Rezeptors RAGE belegt werden. Dabei kann jedoch bei der vergleichsweise geringen Wirkung des AGE-BSA kein signifikanter Rückgang gemessen werden.

Die, auch im Verhältnis zu der Erhöhung von GAS2, relativ schwache Schwankung des mRNS-Levels kann auf eine geringen Bedeutung dieses Proteins *in vitro* bzw. unter AGE-BSA schließen lassen oder aber es müssten weitere Einflüsse und Faktoren erwogen werden, welche *in vivo* ebenfalls eine Rolle spielen (Hyperglykämie, TNF $\alpha$  etc.).

Die *In Situ*-Hybridisierung konnte den Trend zur Erhöhung bestätigen. Als weiterer, schwacher Trend kann eine leicht erhöhte Hybridisation der Sonde in und um die Zellkerne herum beobachtet werden.

Innerhalb einer Probe waren teilweise starke Unterschiede von Zelle zu Zelle zu beobachten, die eine Vergleichbarkeit erschweren und auf andere Einflussfaktoren oder auch methodische Probleme hinweisen könnten.

Insgesamt ist die Expression der GAS2L1-mRNS, auch im Vergleich zur GAS2-mRNS, geringer (Durchschnittlich 1 Zyklus späterer Threshold in der Real-Time-PCR als GAS2 im Vergleich zum Haushaltsgen GAPDH unter gleichen experimentellen Bedingungen) und die Effekte der AGE-BSA-Behandlung in entdifferenzierten Podozyten im Vergleich zu den Kontrollgruppen nicht so deutlich.

In den *in vivo* Versuchen mit diabetischen Mäusen war der Anstieg der GAS2L1 $\alpha$ -mRNS dagegen signifikant. Der Anstieg dieser ist 4,8-fach im Verhältnis zu den nichtdiabetischen Mäusen und damit bedeutend größer als in den *in vitro* Versuchen. Ob dies am Einfluss anderer Zellarten im Gesamtzelllysate der Mausniere, also an den tubulären oder mesangialen Zellen, oder in anderen Stoffwechselfaktoren begründet liegt, welche *in vivo* die Expression von GAS2L1 $\alpha$ -mRNS beeinflussen könnten, kann nicht abschließend geklärt werden. Auch hier müsste in nachfolgenden Versuchen mit größerer Stichprobenzahl gearbeitet werden, um Schwankungen besser beurteilen zu können. Sollten sich diese Ergebnisse

bestätigen, so müsste über eine starke Vernetzung im Stoffwechsel außerhalb der AGEs diskutiert werden und über eine stärkere Bedeutung von *GAS2L1*  $\alpha$  im Verhältnis zu *GAS2* bei der DN spekuliert werden. Dem entgegen stehen die in sich schlüssigeren Ergebnisse der Untersuchungen zu *GAS2*.

### 6.1.2. Überexpression des *GAS2L1* $\alpha$ -Protein

Der Versuch eine Überexpression mit *GAS2L1* $\alpha$  zu erzeugen, um die Effekte dieses Proteins in Podozyten zu untersuchen, zeigte keine nachweisbaren Mengen des c-Myc-gekoppelten Proteins, weder im Westernblot, noch in der immunhistochemischen Färbung.

Ein Apoptose-Assay „Caspase Glo“ konnte keine signifikanten Ergebnisse aufweisen. Dabei ist der Effekt von AGE-BSA auf die Apoptose in der Literatur für Podozyten unterschiedlich beschrieben worden. So berichten z.B. Fukami et al. (2013) über einen verstärkten Effekt auf die Apoptoserate der Podozyten unter AGE-BSA Einfluss in einem *Comet Assay*, während frühere Arbeiten in unserer Gruppe anhand von erhöhter p27<sup>kip1</sup>-Expression keine apoptotischen Effekte nachweisen konnten (Rüster et al. 2008). Die möglichen apoptotischen Effekte der Behandlung mit AGE sowie mit Lipofectamin 2000 Transfektionsreagenz allein reichen jedoch schon aus, um große Schwankungen zu verursachen und Ergebnisse schlecht vergleichbar zu machen.

Für die Fortführung der Untersuchungen wäre die Überprüfung und eventuell neue Durchführung der Überexpression von Bedeutung. Dieser sollten weitere funktionale Assays, wie Proliferationsassays und eine Doppelfärbung mittels Immunfluoreszenz für Myc-*GAS2L1* $\alpha$  und Aktin-Filamente folgen, um Effekte der Überexpression auf das Zytoskelett und die Lokalisation des c-Myc-Tag-markierten *GAS2L1*-Proteins in der Zelle zu bestimmen. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war kein spezifischer *GAS2L1*-Antikörper verfügbar, welcher für eine Detektion des Proteins *in vivo* und die Analyse seiner Funktion in Bezug auf entdifferenzierte Podozyten und die DN hilfreich gewesen wäre.



## 6.2. GAS2

### 6.2.1. GAS2-RNS Expression

Das GAS2-Gen wurde zuerst als Gen des Zellzyklusarrests beschrieben (Schneider et al. 1988). Als dieses bildet es eine Schnittstelle zwischen der Apoptoseregulation durch das Protein p53 und dem Actin-Filamentsystem. Eine Rolle bei den Veränderungen im Zytoskelett, die in Podozyten unter Behandlung mit glykierten BSA zu beobachtet ist (Bondeva et al. 2011), wurde von uns postuliert, da bereits gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von aktiviertem GAS2-Protein zu strukturellen Veränderungen führen kann (Brancolini et al. 1995).

Für GAS2 konnte gezeigt werden, dass der Einfluss des glykierten BSA im Vergleich zum Kontroll-BSA zu einer signifikanten Hochregulation des Gens auf mRNA-Ebene führt (2,26-fache gegenüber Co-BSA). Durch die Zugabe von anti-RAGE-AK ließ sich *in vitro* die GAS2-mRNA wieder signifikant auf Niveau der mit Co-BSA behandelten Podozyten senken (siehe **Abbildung 22**).

Die in diabetischen Mäusen gemessene Erhöhung der GAS2-Expression war mit dem 2,92-Fachen gering höher als die in den Podozyten *in vitro*, wobei der Unterschied hier nicht signifikant war. Dies könnte durch eine Erhöhung der Stichprobenzahl bei einer Wiederholung möglicherweise gezeigt werden. Insgesamt ergibt dies für GAS2 einen kohärenten Befund der mRNA Messergebnisse. Wie bereits in Kapitel 5.5 und 5.11 gezeigt, ist der relative Anstieg der GAS2-mRNA *in vivo* geringer als die der GAS2L1-mRNA.

Dem entgegen steht, dass bei der *in situ*-Hybridisierung von GAS2, trotz absolut höheren mRNA-Gehalts, weder für Podozyten noch für Mausnierenschnitte eine gute Markierung gelungen ist, wobei bei längerer Färbereaktion die Hintergrundfärbung zu stark wurde und kein Unterschied zwischen Antisense- und Sensesonde zu detektieren war. Demnach lassen sich auch keine Aussagen bezüglich der GAS2-mRNA Verteilung in der Niere treffen. Die Frage, ob die Verteilung der GAS2-mRNA zellspezifisch ist oder eine weitere methodische Optimierung erforderlich gewesen wäre, muss offen gelassen werden.

### 6.2.2. GAS2-Proteinexpression

Die Untersuchung der Proteinmenge von GAS2 erfolgte mittels Western Blot. Die GAS2-Proteinexpression ist in Podozyten unter AGE-BSA Behandlung erhöht,



wobei eine Abschätzung mittels der Densitometrie eine Erhöhung um das 1,27-fache ergibt. Dieser Anstieg war im Students-t- Test mit einem  $p < 0,05$  signifikant. Auch die Zugabe von 10%FKS als Wachstumsserum zu unbehandelten Proben zeigte einen mit  $p < 0,05$  signifikanten Unterschied zu den AGE-BSA behandelten Podozyten. Der mit dem Wachstumsfaktoren des FKS verbundene Rückgang der GAS2 Proteinmenge bestätigt die Rolle des GAS2 als Protein des Zellzyklusarrestes und dient somit als Negativkontrolle.

Weiterhin wurde die Expression des GAS2 im Zytosol- und in den Zellkern analysiert. Die Proteinproben bestätigten die AGE-BSA Effekte für das Zytoplasma, konnten jedoch aufgrund der geringeren Versuchszahl keine Signifikanz zeigen. Die gewonnen Zellkernextrakte wiesen nur kleinere Mengen GAS2-Proteins auf. Unterschiede in der Proteinmenge zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen konnten hier nicht gesehen werden. Dies entspricht den Berichten aus der Literatur, wonach GAS2 als Protein des Zytoskelettes im Nukleus eine untergeordnete Rolle spielt (Brancolini et al. 1995).

### **6.2.3. GAS2 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz**

Die intrazelluläre Verteilung des GAS2 wurden in Podozyten und Parafinschnitten von diabetischen und nichtdiabetischen Mäusen mittels immunhistochemischer- und Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Die Bilder zeigten Ergebnisse, die kohärent waren zu den Proteinerhöhungen und Verteilung in den Western Blots:

Die Färbung der Podozyten bestätigte eine Erhöhung der Gesamtmenge an GAS2 nach AGE-BSA-Behandlung. Es konnte jedoch keine Umverteilung der Proteine unter AGE-BSA detektiert werden. Auch hierbei variierte die Signalintensität innerhalb einer Probengruppe stark. Zu bemerken ist, dass sich unter den stark markierten Zellen auch solche fanden, die erhöhte Färbungen nahe dem Zellkern aufweisen.

Die Immunfluoreszenzmarkierung der Podozyten zeigt keine so deutlichen Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen wie in der IHC. Die bessere strukturelle Auflösung zeigte jedoch in wenigen Zellen die in der Literatur (z.B. für Fibroblasten) beschriebene netzförmige Verteilung(Brancolini et al. 1992). Diese Zellen zeigten die filamentartigen Strukturen tendenziell eher peripher, dann jedoch auch mit geringfügig stärkerer Intensität als die benachbarten Podozyten. In

den meisten Zellen dagegen konnte eine eher granuläre Strukturierung beobachtet werden, die auf eine geringe Aktivierung des GAS2 hinweisen kann.

Insgesamt wurden für die Bildgebung eher lange Belichtungszeiten für die IF bzw. lange Entwicklungszeit für die IHC Färbereaktion benötigt, was für geringe intrazelluläre Konzentrationen spricht.

Die GAS2-Proteinverteilung und Menge unter diabetischen Bedingungen *in vivo* wurde ebenfalls durch immunhistochemischer Färbung und Immunfluoreszenzfärbung beurteilt. Die Markierung erfolgte an Nieren von diabetischen (*db/db*) bzw. nicht diabetischen heterozygoten (*db/m*) Mäusen.

In der Auswertung zeigte sich eine leicht stärkere Färbung der Glomeruli diabetischer Mäuse im Verhältnis zu der von Kontrolltieren. Dieser Unterschied konnte durch Auswertung der Graustufenwerte der jeweiligen Glomeruli als signifikant gezeigt werden und eine verstärkte Abundanz des GAS2 Proteins konnte so gezeigt werden. Gestützt wird diese Annahme weiterhin durch das Auftreten stark markierter Zellen innerhalb der Glomeruli. Diese traten, normiert auf die Fläche der Glomeruli, signifikant häufiger in den diabetischen Mäusen auf als in den Kontrolltieren. Ob dies für einen zusätzlichen Anstieg der GAS2 Expression unter diabetischen Stoffwechselbedingungen, speziell unter AGE-Einfluss, spricht, oder einer Änderung der Verteilung unter möglicherweise apoptotischen Bedingungen unterliegt, bleibt zu klären.

Die Immunfluoreszenzfärbung der Nieren diabetischer bzw. nichtdiabetischer Mäuse brachten keine so deutlichen Unterschiede wie immunhistochemische Färbung. Intrazellulär waren in der Immunfluoreszenz der Podozyten keine eindeutigen intrazellulären oder strukturellen Veränderungen *in vivo* sichtbar.

Die insgesamt schwächere Immunfluoreszenzfärbung der Glomeruli im Vergleich zum benachbarten tubulären Gewebe steht im Widerspruch zur gleichmäßigen Färbung des Nierenparenchyms in der IHC. Aufgrund der höheren Stichprobengröße, wird hier in der IHC der dargestellten Proteinverteilung des GAS2 mehr Bedeutung beigemessen.

In den Glomeruli ist, neben einer starken Markierung der Makula densa, ebenfalls eine Färbung einzelner Zellen sichtbar, wie sie schon in der IHC beobachtet werden konnte. Diese sind durch die Doppelfärbung des Synaptopodins eindeutig als Podozyten einzuordnen. Hier sieht man die Markierung des GAS-Proteins im

Zytoplasma, an dessen Saum Synptopodin zu sehen ist. Bemerkenswert ist weiterhin, dass die Regionen der Zellkerne eher schwach gefärbt wurden.

Die Hauptexpression des GAS2-Proteins im Zytosol der Podozyten bestätigt unsere vorhergehenden und die in der Literatur für andere Zellen beschriebenen Untersuchungen.

Die Erkrankungsdauer der Mäuse an Diabetes mellitus Typ 2 ist ein weiter, kritisch zu betrachtender Punkt. Die Nieren und Glomeruli wurden in einem Alter von 12-14 Wochen entnommen, wobei bekannt ist, dass in diesen Zeiträumen noch keine lange Erkrankungsdauer vorliegt. Damit könnten die hyperglykämischen Bedingungen nicht lange genug vorliegen, um die Bildung eines erhöhten AGE-Spiegel im Serum und die Akkumulation im Gewebe verursacht zu haben.

Langzeitexperimente mit diabetischen Mäusen mit DM Typ I sind zurzeit in der Arbeitsgruppe in der Durchführung.

### **6.3. Blockade des RAGE-Rezeptors durch anti-RAGE-Antikörper**

Die beschriebenen *in vitro*-Effekte, die von glykierten BSA in Bezug auf die erhöhte Expression der beiden untersuchten Gene *GAS2L1 $\alpha$*  und *GAS2* und des GAS2 Proteins ausgelöst wurden, konnten durch die Zugabe von Antikörpern gegen den AGE-Rezeptor RAGE rückgängig gemacht werden. In den Fällen, in denen der Unterschied zwischen AGE-BSA und Co-BSA-behandelten Zellen signifikant war, war auch der Rückgang signifikant (*GAS2*-mRNS, *GAS2*-Protein). Die IHC der Podozyten für *GAS2* zeigte ähnliche, jedoch nicht quantifizierbare Effekte. Für *GAS2L1*-mRNS war der Anstieg unter AGE-Behandlung nicht stark genug, um entsprechende Effekte zu erzeugen.

Die Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Konzentration des anti-RAGE-AK zeigten für geringe Verdünnungen des anti-RAGE-AKs starke Schwankungen, die am ehesten mit unspezifischen Effekten des IgG-Antikörpers selbst zurück zu erklären sind.

Auf Proteinebene war in der Optimierung ebenfalls für alle AK-Verdünnungen eine leichte Erhöhung der *GAS2* Expressionslevel zu sehen. Wobei sich eine Annäherung der gemessenen Proteinmengen der AGE- und Co-BSA behandelten Podozyten unter sinkender Verdünnung zeigte. Die Aussagen betreffen jedoch nur zwei Messungen und sollten deswegen nicht zu stark gewichtet werden.

Die möglicherweise toxischen Effekte des Antikörpers, die nicht über die Wirkung der Rezeptorblockade zustande kam, können zu weiteren Verzerrungen geführt haben. Um diese besser beurteilen zu können, wurde zur Testung des anti-RAGE-AK stets auch eine Kontrolle mit der gleichen Konzentration mit Co-BSA und serumfreien (0,1% FKS) RPMI 1640-Medium durchgeführt. Die geringen Verdünnungen des anti-RAGE-AK zeigten dann auch starke Schwankungen, so dass die Behandlungen mit einer mittleren Konzentration vorgenommen wurden.

Die gute Blockierung der durch AGE induzierten Effekte mittels anti-RAGE-AK wurden bereits in anderen Arbeiten gezeigt (Busch 2010, Ishibashi 2013, Müller-Krebs et al. 2012) und kann hier für *GAS2* und *GAS2L1 $\alpha$*  bestätigt werden. Ein weiter Nachweis der Reversibilität der Effekte, z.B. durch die Zugabe des löslichen RAGE (sRAGE) oder durch AT<sub>1</sub>-R-Blocker lassen weitere Erkenntnisse bzw. Bestätigungen erwarten.

Die Bindung des Antikörpers an den Rezeptor zeigt also eine gute Blockierung der von AGE ausgelösten Effekte und bestätigt deren Wirkung über den RAGE. Weitere Aussagen über die möglichen nachfolgenden Signalwege können nur spekulativ sein. Am wahrscheinlichsten ist die bekannte NF- $\kappa$ B und TGF- $\beta$  Achse.

Andere Einflüsse und Effekte, die *in vivo* auftreten und zur Erhöhung der Expression der Gene oder Proteine führen können, können zurzeit noch nicht benannt werden. So sind Signalwege über andere Effektoren außer dem RAGE-Rezeptor bei der DN denkbar.

Hierzu zählen andere Rezeptoren für AGE, wie z.B. der AGE-R<sub>1-3</sub> Komplex, welcher nicht durch den anti-RAGE-Antikörper blockiert werden. Für diese ist jedoch eher eine Bedeutung im Abbau der AGEs und nicht der Eingriff in die Regulierung des Zellzyklus beschrieben (Busch 2010). Auf Grund dessen und wegen der guten Reversibilität wurden diese Rezeptoren auch nicht weiter untersucht.

Eine Möglichkeit, die Wirkung und den Einfluss des AGE-Rezeptors *in vivo* besser beurteilen zu können, ist auch hier der Einsatz von löslichem s-RAGE. Dieses kann Mäusen injiziert werden und bindet als löslicher Faktor diverse AGEs und kann somit zumindest einen Teil dieser aus dem Plasma entfernen, ohne den RAGE-Rezeptor zu beeinflussen.

Abschließend kann postuliert werden, dass zwar die beobachteten Erhöhungen der Expressionen durch die Blockade des RAGE verhindert werden konnten. Die genaue Bedeutung vor allem *in vivo* muss jedoch offen bleiben.

## 7. Schlussfolgerungen

- In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Advanced Glycation Endproducts und der Expression der Zellzyklusarrestgene *GAS2L1 $\alpha$*  und *GAS2* bzw. deren Proteine in Podozyten untersucht.
- Zusammenfassend lässt sich dabei feststellen, dass beide Gene durch den Einfluss von AGEs *in vivo* hochreguliert werden. Ebenfalls ist ein Anstieg des *GAS2*-Proteins *in vitro* unter AGE-BSA Behandlung als auch *in vivo* im diabetischen Mausmodell zu verzeichnen gewesen. Die beobachteten Effekte waren *in vitro* durch eine RAGE-Blockade reversibel.
- Obwohl eine Korrelation zwischen AGEs bzw. diabetischen Zuständen und der verstärkten Expression der Zellzyklusarrest-Gene *GAS2* und *GAS2L1* aufgezeigt werden konnte, fehlt aufgrund des noch nicht genau geklärten Stoffwechselweges, der unbekannten Zwischenschritte in Regulation und Abbau und der genauen funktionellen Bedeutung beider Proteine in der Pathophysiologie der DN der Nachweis der Kausalität. In der Literatur wurden diverse, mögliche Stoffwechsel beschrieben, die eventuell eine Rolle spielen könnten. So kann z.B. TGF- $\beta$  den Zellzyklusarrest unter bestimmten Bedingungen einleiten (Monkawa et al. 2002).
- Die Rolle von *GAS2L1 $\alpha$*  in der DN ist wohl als eher untergeordnet einzuschätzen. In wie weit das *GAS2L1 $\alpha$*  als Protein in der Niere eine Rolle spielt, kann auch aufgrund des Fehlens eines Antikörpers, nicht abschließend beantwortet werden.
- Eine Hochregulation in der *GAS2L1*-mRNS in diabetischen Mäusen sollte Anlass zu weiteren Untersuchungen geben. Als Protein wurde *GAS2L1 $\alpha$* -Isoform bisher nur in humanem Hirn- sowie Herzgewebe sowie in murinen Hirn und Testikelgewebe gefunden. Dort konnte auch bei Überexpression in Zellen die Bindung an Aktinfilamente und Mikrotubuli gezeigt werden. (Goriounov 2003). Das Verständnis für die Regulation des Genes und des Proteins fehlt.
- Für die Expression von *GAS2* konnten dann die stärkeren und konsistenteren Veränderungen beobachtet werden, zumal hier auch für die Untersuchung der Proteine ein Antikörper zur Verfügung steht. Ob diese leicht erhöhte

## Schlussfolgerungen

Expression jedoch zu den bereits beschriebenen Veränderungen des Zytoskeletts führen (Bondeva et al. 2011), lässt sich nicht abschließend klären. Wenn jedoch aufgrund der Ergebnisse des Caspase Glo Assays davon ausgegangen wird, dass die hier erfolgte Behandlung mit AGE-BSA keine apoptotischen Prozesse auslöst, so kann dies eine Erklärung für die fehlende Aktivierung des Proteins durch die Caspasen sein (Brancolini et al. 1995). Erst unter dieser Aktivierung ist in Fibroblasten eine Umlagerung des GAS2-Proteins und eine Umstrukturierung der Aktin-Filamente beobachtet worden.

- Der Einfluss der Behandlung mit glykiertem BSA auf die Translokation beider Proteine in die mikrofilamentären Strukturen im Podozyten kann also nur aus der Immunfluoreszenz und nur für GAS2 beschrieben werden. Inwieweit die gefundenen, eher diffusen Verteilungen *in vitro* eine wirkliche Akkumulation bedeuten und ob der Aktivierungsgrad der Proteine verändert ist, bedarf also weiterer Untersuchungen.
- Daraus folgt, dass der in Podozyten hervorgerufene Zellzyklusarrest zwar zu mit einer Hochregulation des GAS2 Proteins korreliert, die stark aktive, Zytoskelett formende GAS2-Form wahrscheinlich aber erst unter apoptotischen Bedingungen auftritt. Diese Bedingungen konnten unter unseren *in vitro*-Bedingungen im Apoptose-Assay nicht gemessen werden, so dass bei unverändertem Mikrofilament davon auszugehen ist, dass die Aktivierung des GAS2-Proteins noch nicht stattgefunden hat.
- Die Reversibilität der von AGE-BSA ausgelösten Effekte durch Blockierung des Rezeptors RAGE kann als Nachweis des ersten Schrittes in der Wirkkette der AGEs in der DN gesehen werden und bestätigt diesen als wichtigen Faktor in der Pathogenese. Weitere Schritte in der Signalkaskade wurden nicht untersucht.
- Gezeigt wurde weiterhin, dass das GAS2-Protein in der DN auch *in vivo*, wenn auch nur in kleinem Umfang, eine Rolle spielt und dass diese Effekte auch in differenzierten Podozyten zu finden sind.

## 8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Arai H, Nagai K, Doi T. 2008. Role of growth arrest-specific gene 6 in diabetic nephropathy. *Vitamins and Hormones*, 78: 375-392.
- Barrett A, Pellet-Many C, Zachary IC, Evans IM, *Franke* P. 2013. p130Cas: a key signalling node in health and disease. *Cellular Signaling* (4): 766-777.
- Benetti R, Del Sal G, Monte M, Paroni G, Brancolini C, Schneider C. 2001. The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis. *EMBO Journal*, 20(11): 2702-2714.
- Bondeva T, Heinzig J, Ruhe C, Wolf G. 2013. Advanced glycated end-products affect HIF-transcriptional activity in renal cells. *Molecular Endocrinology* 27(11):1918-1933.
- Bondeva T, Rüster C, Franke S, Hammerschmid E, Klagsbrun M, Cohen CD, Wolf G. 2009. Advanced glycation end-products suppress neuropilin-1 expression in podocytes *Kidney International* 75(6):605-616.
- Bondeva T, Wolf G. 2009. Advanced glycation end products suppress neuropilin-1 expression in podocytes by a reduction in Sp1-dependent transcriptional activity. *American Journal of Nephrology*, 30(4): 336-345.
- Bondeva T, Wojciech S, Wolf G. 2011. Advanced glycation end products inhibit adhesion ability of differentiated podocytes in a neuropilin-1-dependent manner. *American journal of physiology. Renal physiology*, 301(4): F852-F870.
- Brancolini C, Benedetti M, Schneider C. 1995. Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *The EMBO Journal*, 14(21): 5179-5190.
- Brancolini C, Bottega S, Schneider C. 1992. Gas2, a growth arrest-specific protein, is a component of the microfilament network system. *The Journal of Cell Biology*, 117(6): 1251-1261.
- Brancolini C und Schneider C. 1994. Phosphorylation of the growth arrest-specific protein Gas2 is coupled to actin rearrangements during G0 3 G1 transition in NIH 3T3 cells. *The Journal of Cell Biology*, 124: 743–756.
- Bucala R, Vlassara H, Cerami A. 1994. Advanced glycosylation endproducts: role in diabetic and non-diabetic vascular disease. *Drug Dev Res*, 32:77–89.
- Busch M, Franke S, Rüster C, Wolf G. 2010. Advanced glycation end-products and the kidney. *European Journal of Clinical Investigation*, 40 (8): 742–755.

- Choudhury D, Tuncel M, Levi M. 2010. Diabetic nephropathy -- a multifaceted target of new therapies. *Discovery in Medicine*, 54: 406-415.
- Deetjen P, Speckmann E-J, Heschler J, Hrsg. 2005. *Physiologie*. 4. Aufl. München Jena: Urban & Fischer Verlag. 516-517.
- Durvasula RV, Shankland SJ. 2008. Activation of a local renin angiotensin system in podocytes by glucose. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 294(4): F830-839.
- Evans IM, Yamaji M, Britton G, Pellet-Many C, Lockie C, Zachary IC, Frankel P. 2011. Neuropilin-1 signaling through p130Cas tyrosine phosphorylation is essential for growth factor-dependent migration of glioma and endothelial cells. *Molecular and Cellular Biology*, 31(6): 1174-1185.
- Frei U, Schober-Halstenberg HJ. 2008. Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. Berlin: QuaSi – Niere, 35-36.
- Fukami K, Yamagishi S, Kaifu K, Matsui T, Kaida Y, Ueda S, Takeuchi M, Asanuma K, Okuda S. 2013. Telmisartan inhibits AGE-induced podocyte damage and detachment. *Microvascular Research*, 88: 79-83.
- Gamper I, Koh KR, Ruau D, Ullrich K, Bartunkova J, Piroth D, Hacker C, Bartunek P, Zenke M. 2009. GAR22: A novel target gene of thyroid hormone receptor causes growth inhibition in human erythroid cells. *Experimental Hematology* 37: 539–548.
- Giaccia AJ und Kastan MB. 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes & Development*, 12: 2973–2983.
- Gonen H, Shkedy D, Barnoy S, Kosower NS, Ciechanover A. 1997. On the involvement of calpains in the degradation of the tumor suppressor protein p53. *FEBS Letter*, 406(1-2):17-22.
- Goriounov D, Leung CL, Liem RK. 2003. Protein products of human Gas2-related genes on chromosomes 17 and 22 (hGAR17 and hGAR22) associate with both microfilaments and microtubules. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 6): 1045-1058.
- Gugliucci A, Bendayan M. 1996. Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia*, 39: 149–160.
- Ha TS, Choi JY, Park HY, Han GD. 2013. Changes of podocyte p130Cas in diabetic conditions. *Journal of Nephrology*, 5: 0



- Haslbeck KM, Neundörfer B, Schlötzer-Schrehardt U, Bierhaus A, Schleicher E, Pauli E, Haslbeck M, Hecht M, Nawroth P, Heuss D. 2007. Activation of the RAGE pathway: a general mechanism in the pathogenesis of polyneuropathies? *Neurological Research*, 29(1): 103-110.
- Huang W, Zhou W, Saberwal G, Konieczna I, Horvath E, Katsoulidis E, Platanias LC, Eklund EA. 2010. Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) decreases beta-catenin activity in myeloid cells by repressing GAS2 transcription. *Molecular and Cell Biology*, 30(19): 4575-4594.
- Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. 1966. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*, 153: 1127–1128.
- Ishibashi Y, Matsui T, Ohta K, Tanoue R, Takeuchi M, Asanuma K, Fukami K, Okuda S, Nakamura K, Yamagishi S. 2013. PEDF inhibits AGE-induced podocyte apoptosis via PPAR-gamma activation. *Microvascular Research*, 85: 54-58.
- Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, Chugh S, Danesh FR. 2008. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. *Experimental Biology and Medicine* (Marywood, NY), 233(1):4-11.
- Komorniczak M. 2009. Medical Illustrations. Gdansk (Polen): University Medical of Gdansk.
- Landgraf R. 1996. Impact of pancreas transplantation on diabetic secondary complications and quality of life. *Diabetologia*, 39: 1415–1424.
- Lee HB, Seo JY, Yu MR, Uh ST, Ha H. 2007. Radical approach to diabetic nephropathy. *Kidney International. Supplement*, 106: S67–S70.
- Lee IJ1, Hilliard B, Swami A, Madara JC, Rao S, Patel T, Gaughan JP, Lee J, Gadegbeku CA, Choi ET, Cohen PL. 2012. Growth arrest-specific gene 6 (Gas6) levels are elevated in patients with chronic renal failure. *Nephrology, Dialysis and Transplantation*, 27(11): 4166-4172.
- Lee KKH, Tang MK, Yew DTW, Chow PH, Yee SP, Schneider C, Brancolini C. 1999. Gas2 Is a Multifunctional Gene Involved in the Regulation of Apoptosis and Chondrogenesis in the Developing Mouse Limb. *Developmental Biology*, 207: 14–25.
- Liebisch M, Bondeva T, Franke S, Daniel C, Amann K, Wolf G. 2014. Activation of the receptor for advanced glycation end products induces nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 suppression. *Kidney international*, 86(1): 103-117.

- Livak KJ und Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego Calif.)*, 25(4):402-408.
- Monkawa T, Hiromura K, Wolf G, Shankland SJ. 2002. The hypertrophic effect of transforming growth factor-beta is reduced in the absence of cyclindependent kinase-inhibitors p21 and p27. *Journal of American Society of Nephrology*, 13: 1172–1178
- Mundel P, Reiser J, Zúñiga Mejía Borja A, Pavenstädt H, Davidson GR, Kriz W, Zeller R. 1997. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Experimental Cell Research*, 236(1): 248-258.
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. 1992. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (21): 14998-15004.
- Park JK, Theuer S, Kirsch T, Lindschau C, Klinge U, Heuser A, Plehm R, Todiras M, Carmeliet P, Haller H, Luft FC, Muller DN, Fiebeler A. 2009. Growth arrest specific protein 6 participates in DOCA-induced target-organ damage. *Hypertension*, 54(2): 359-364.
- Pichiule P, Chavez JC, Schmidt AM, Vannucci SJ. 2007. Hypoxia-inducible factor-1 mediates neuronal expression of the receptor for advanced glycation end products following hypoxia/ischemia. *Journal for Biological Chemistry*, 282(50): 36330–36340.
- Ritz E, Lippert J, Keller C. 1996. Rapider Anstieg der Zahl niereninsuffizienter Typ-II-Diabetiker: Nicht nur ein Problem der Nephrologen. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 121(41): 1247.
- Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Tumova S, Rauvala H. 2013. RAGE-mediated cell signaling. *Methods Molecular Biology*, 963: 239-263.
- Ruster C, Bondeva T, Franke S, Forster M, Wolf G. 2008. Advanced glycation end-products induce cell cycle arrest and hypertrophy in podocytes. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23: 2179–2191.
- Saito A, Takeda T, Sato K, Hama H, Tanuma A, Kaseda R, Suzuki Y, Gejyo F. 2005. Significance of proximal tubular metabolism of advanced glycation end products in kidney diseases. *Annual New York Academic Science*, 1043: 637–643.

- Schneider C, King RM, Philipson L. 1988. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell*, 54: 787-793.
- Sgorbissa A, Benetti R, Marzinotto S, Schneider C, Brancolini C. 1999. Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 in vitro: implications for microfilament reorganization during apoptosis. *Journal of Cell Science*, 112 (Pt 23): 4475-4482.
- Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. 2004. Amphotericin stimulates myogenesis and counteracts the antimyogenic factors basic fibroblast growth factor and S100B via RAGE binding. *Molecular Cell Biology*, 24: 4880–4894.
- Soulis T, Thallas V, Youssef S, Gilbert RE, McWilliam BG, Murray-McIntosh RP, Cooper ME. 1997. Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. *Diabetologia*, 40: 619–628.
- Sun D, Leung CL, Liem RK. 2001. Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 1):161-172.
- Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, Ferrario F, Fogo AB, Haas M, de Heer E, Joh K, Noël LH, Radhakrishnan J, Seshan SV, Bajema IM, Bruijn JA; Renal Pathology Society. 2010. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(4):556-563
- Tesch GH und Lim AKH. 2010. Recent insights into diabetic renal injury from the db/db mouse model of type 2 diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 300: F301-F310.
- Thornalley PJ, Rabbani N. 2009. Highlights and hotspots of protein glycation in end-stage renal disease. *Seminars in Dialysis* 22: 400–404.
- Tsuji A, Wakisaka N, Kondo S, Murono S, Furukawa M, Yoshizaki T. 2008. Induction of receptor for advanced glycation end products by EBV latent membrane protein 1 and its correlation with angiogenesis and cervical lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Clinical Cancer Research* 14: 5368–5375.
- Wells-Knecht KJ, Brinkmann E, Wells-Knecht MC, Litchfield JE, Ahmed MU, Reddy S, Zyzak DV, Thorpe SR, Baynes JW. 1996. New biomarkers of Maillard reaction damage to proteins. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 11 Suppl. 5: 41–47.

## Literatur- und Quellenverzeichnis

- Welsh GI, Coward RJ. 2010. Podocytes, glucose and insulin. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 19(4): 379-384.
- Wolf, G. 2004. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from hemodynamics to molecular pathology. *European Journal of Clinical Investigation*, 34: 785–796.
- Wolf G. 2008. Novel aspects of the renin-angiotensin-aldosterone-system. *Frontiers in Bioscience*, 13:4993-5005.
- Yamagishi S, Matsui T. 2010. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3:2, 101-108.
- Zucman-Rossi J, Legoix P, Thomas G. 1996. Identification of new members of the Gas2 and Ras families in the 22q12 chromosome region. *Genomics* 38(3): 247-254.

## 9. Anhang

### 9.1. Lebenslauf

Name: Stephan Hause

Geburtsdatum: 11. Juli 1987

Geburtsort: Halle (Saale)

Familienstand: Ledig

Anschrift: Helmstedter Str. 9, 39112 Magdeburg

#### **Schule:**

07.1991 – 12.1993 Nude School, Wageningen, Gelderland, NL

01.1994 – 07.1997 Grundschule am Heiderand, Halle

09.1997 – 07.2006 Georg-Cantor-Gymnasium Halle, Abitur 2006

#### **Studium**

10.2006 – 09.2013 Studium der Humanmedizin an der FSU Jena

08.2011 – 01.2012 Promotionsstipendium des IZKF (Urlaubssemester)

09.2008 Erster Teil der ärztlichen Prüfung M1

05.2013 Zweiter Teil der ärztlichen Prüfung M2

06.2013 Approbation

10.2013 Posterpräsentation 5. Jahrestagung DGfN in Berlin .

#### **Anstellung:**

Seit 11.2013 Assistenzarzt in der Universitätsklinik für Neurologie des  
Universitätsklinikums Magdeburg

#### **Praktika:**

07./09.2006, 02.2007 Famulatur Innere Medizin im Hlk. Bad Langensalza

08.2009 Famulatur Anästhesie im BG Bergmannstrost Halle

02.2010 Famulatur Allgemeinchirurgie an der Radboud Universiteit

09.2010 Nijmegen, Niederlande

Famulatur Gynäkologie im Matema Lutheran Hospital,  
03.2011 Tanzania

---

Ort, Datum

---

Stephan Hause

## **9.2. Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Stephan Hause,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Professor Dr. G. Wolf, MHBA, Dr. T. Bondeva, Dr. I. Löffler, Dr. M. Liebisch, Prof. Dr. B. Hause.

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 25.09.2015

Stephan Hause, Verfasser

### 9.3. Danksagung

Ich möchte hiermit die Gelegenheit nutzen und meinem Betreuer und Doktorvater Professor Dr. Gunter Wolf, MHBA zu danken für die Bereitstellung des Themas, der inhaltlichen und fachlichen Unterstützung sowie dem Rückhalt bei der Bewerbung für das Promotionsstipendium des IZKFs.

Ebenfalls danke ich Frau Dr. Tzvetanka Bondeva für die intensive Betreuung und Anleitung im Labor und das stets offene Ohr für meine Fragen und Probleme.

Auch für die Unterstützung durch die Mitarbeiterinnen im Labor der Nephrologie bei all den kleineren und größeren Handgriffen kann ich nicht genug dank sagen. Besonders hervorgehoben seien Frau Dr. Ivonne Löffler und Frau Dr. Marita Liebisch für die Unterstützung

Dem *Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung* sei gedankt für die großzügige Bereitstellung des Promotionsstipendiums.

Zu guter Letzt möchte ich noch meinen Eltern danken, die mich immer wieder motiviert haben und mir so oft Stütze waren.